

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Louise VEILLET-PONCET

sujet :

La flore bactérienne
indologène aéro-anaérobie
des laits pasteurisés conditionnés
Cas particulier d'Aeromonas

Soutenue publiquement le 21 Décembre 1973

JURY :

MM. E. CHAPON

Président

E. de LAVERGNE

J. JACQUET

R. BUTTIAUX

Examineurs

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Louise VEILLET-PONCET

sujet :

La flore bactérienne
indologène aéro-anaérobie
des laits pasteurisés conditionnés
Cas particulier d'Aeromonas

Soutenue publiquement le 21 Décembre 1973

JURY :

MM. E. CHAPON

Président

E. de LAVERGNE

J. JACQUET

R. BUTTIAUX

Examineurs

ERRATA

Page 14, tableau IV, lire à gauche $N \leq 3.10^4/\text{ml}$ et à droite $N > 3.10^4/\text{ml}$.

Page 20, ligne 16 et page 62, ligne 17 lire piqure.

Page 23, ligne 6 lire l'urée.

Page 32, ligne 3 lire virant et non variant.
ligne 7 lire l'une ou l'autre.

Page 34, lire β -galactosidase.

Page 36, ligne 1 lire permettre.

Page 40, ligne 23 lire achromogènes.

Page 41, ligne 26 lire accompagnée.

Page 51 lire :

$$X_c^2 = \frac{N \left[|ad-bc| - \frac{N}{2} \right]^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Page 60, ligne 2, lire ichthyopathologie.

Page 68, ligne 6 et page 84, ligne 15, lire Hammarsten.

Page 71, ligne 10, lire hydrolysate acide de caséine.

Page 89, ligne 3, lire grand groupe des bactéries.

Page 92, ligne 10, lire un certain nombre.

AVANT-PROPOS

Au moment d'exposer notre travail effectué dans le laboratoire de Microbiologie de l'Ecole de Laiterie, nous adressons nos plus vifs remerciements à tous les membres de la Commission d'examen: à Monsieur le Docteur BUTTIAUX, Directeur de l'Institut Pasteur de Lille dont l'enseignement de Bactériologie Alimentaire nous a appris à travailler avec rigueur, à Monsieur le Professeur de LAVERGNE qui a accepté d'être rapporteur, à Monsieur le Professeur CHAPON, Président du jury, et à Monsieur le Professeur JACQUET de l'Université de Caen. Tous, malgré leurs multiples charges et leurs déplacements, ont accepté de lire et de juger notre travail.

Qu'il nous soit permis d'associer à ces remerciements Mesdames Monique MICHEL et Liliane MICHEL dont la minutie et l'efficacité nous ont été très précieuses.

Enfin nous ne saurions oublier toutes celles et tous ceux qui, de près ou de loin tant à l'Ecole de Laiterie qu'à l'I. U. T. et à l'U. E. R. Alimentation et Nutrition nous ont encouragée et aidée.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551912_0050

SOMMAIRE

	Pages
I - INTRODUCTION	1
II - EVALUATION DE LA QUALITE DES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES	
1. MATERIEL ET METHODES	6
1.1. Les échantillons	6
1.2. Contrôle de la pasteurisation	6
1.3. Contrôle bactériologique	7
1.4. Acidité Dornic	10
2. RESULTATS	11
III - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES FLORES BACTERIENNES, INDOLOGENE AERO-ANAEROBIE ET COLIFORME, A PARTIR DE 288 ECHANTILLONS CONTAMINES PAR DES BACTERIES INDOLOGENES	
1. METHODE	17
1.1. Isolements	17
1.2. Identifications	18
2. RESULTATS	25
2.1. Isolements	25
2.2. Identification des 2 397 souches isolées	27

2.2.1. Détermination des souches possédant une catalase et dépourvues de cytochrome-oxydase et d'oxydase	28
2.2.1.1. Position taxonomique des coliformes	28
2.2.1.2. Coliformes et autres <u>Enterobacteriaceae</u> isolés	31
2.2.2. Détermination des souches possédant une catalase, cytochrome-oxydase et oxydase	35
2.2.2.1. Position systématique des <u>Aeromonas</u>	36
2.2.2.2. Définition du genre <u>Aeromonas</u>	41
2.2.3. Entérobactéries et <u>Aeromonas</u> isolés des 288 échantillons, sur 507, contaminés par des bactéries indologènes	43
2.2.4. Etude des souches d' <u>Aeromonas</u> isolées	46

V - ETUDE STATISTIQUE DE LA FLORE INDOLOGENE AERO-ANAEROBIE ISOLEE DES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES

1. METHODE	49
2. FREQUENCE DE LA CONTAMINATION PAR <u>AEROMONAS</u>	50
3. COMPARAISON ENTRE LA CONTAMINATION PAR LES ENTEROBACTERIES INDOLOGENES ET LA CONTAMINATION PAR <u>AEROMONAS</u>	50
4. COMPARAISON ENTRE LA CONTAMINATION PAR <u>E. COLI</u> ET LA CONTAMINATION PAR <u>KLEBSIELLA INDOLOGENE</u>	52

V - INTERPRETATION DE LA PRESENCE D'AEROMONAS DANS LES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	53
1.1. <u>Aeromonas</u> et pathologie des Poikilothermes	53
1.2. <u>Aeromonas</u> et pathologie des Homéothermes, plus particulièrement de l'Homme	56
1.3. <u>Aeromonas</u> et bactériologie alimentaire	59
2. DISCUSSION	60

VI - ACTION SUR LE LAIT DES AEROMONAS ISOLEES ET ETUDE DU SYSTEME ENZYMATIQUE COAGULANT ET PROTEOLYTIQUE CHEZ UNE DES SOUCHES, AEROMO- NAS HYDROPHILA ELP 5

1. ACTION SUR LE LAIT DES SOUCHES ISOLEES	62
1.1. Conditions de culture	62
1.2. Résultats	63
2. LE SYSTEME ENZYMATIQUE COAGULANT ET PROTEOLYTIQUE CHEZ <u>AEROMONAS HYDRO-</u> <u>PHILA</u> ELP 5	66
2.1. Méthodes	66
2.1.1. Conditions de culture	66
2.1.2. Obtention de la solution enzymatique	66
2.1.3. Mesure de l'activité coagulante	67
2.1.4. Mesure de l'activité protéolytique	68
2.2. Le système enzymatique coagulant et protéolytique	68
2.2.1. Conditions de production	68
2.2.2. L'extrait enzymatique	74

VII - DISCUSSION

1. QUALITE BACTERIOLOGIQUE DES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES CONTROLES	88
2. COLIFORMES ET <u>AEROMONAS</u>	92
3. ORIGINE DES <u>AEROMONAS</u> DES LAITS PAS- TEURISES CONDITIONNES	94
4. <u>AEROMONAS</u> , BACTERIE COAGULANTE, PROTEOLYTIQUE ET PSYCHROTROPHE	96

VIII - CONCLUSION	102
-------------------	-----

IX - ANNEXE	104
-------------	-----

X - BIBLIOGRAPHIE	111
-------------------	-----

Abréviations utilisées dans le texte

A. P. P.	= acide phényl-pyruvique
B. N.	= bouillon nutritif
C	= coliforme
D. C. L.	= désoxycholate-citrate-lactose-agar
D. L. A.	= désoxycholate-lactose-agar
E. P.	= eau peptonée
G. N.	= gélose nutritive inclinée
G. P. B.	= gélose lactosée au pourpre de bromocrésol
I	= indologène
R. M.	= test au rouge de méthyle
V. B.	= bouillon bilié lactosé au vert brillant
V. L.	= viande-levure
V. P.	= test de Voges-Proskauer

I - INTRODUCTION

Nous savons tous l'importance que présente pour la santé publique un approvisionnement en lait de qualité bactériologique garantie et nous connaissons les conséquences de la contamination du lait par certains groupes de bactéries sur la technologie des produits laitiers.

Si nous envisageons le problème du contrôle bactériologique du lait pasteurisé en France depuis une quarantaine d'années, nous voyons qu'avant 1939, PIEN et coll. (255) (256), GUITTONEAU et coll. (135) (136), et MOCQUOT et coll. (229) s'intéressent à la bactériologie du lait pasteurisé d'une part en signalant l'importance de la recherche de "Bacterium coli" du point de vue hygiénique et industriel, et d'autre part en essayant de mettre au point une méthode de contrôle en vue d'établir des normes bactériologiques.

Le 26 avril 1939 paraît un décret, concernant le lait pasteurisé certifié, qui stipule :

- " 1) Absence de germes pathogènes ;
- 2) Absence de germes coliformes dans 1 ml ;
- 3) Moins de 30 000 germes vivants dans 1 ml."

Mais le protocole de contrôle qui devait être précisé par un arrêté ultérieur ne sera jamais défini et ne paraîtra pas.

Les perturbations provoquées par la guerre de 1939 - 1945 ne permettent pas un contrôle bactériologique rigoureux des

laits destinés à la consommation humaine et, pendant la guerre et sitôt après, nous sommes personnellement témoin de véritables épidémies, plus particulièrement chez les nourrissons, provoquées par la consommation de laits insalubres.

En 1950, BUTTIAUX et KESTELOOT (40) préconisent la recherche des principaux germes pathogènes dans le lait pasteurisé certifié et donnent un schéma de contrôle pour rechercher Bacille de Koch, Brucella, Salmonella et autres germes de contamination fécale, Shigella, Staphylocoques pathogènes, Streptocoques hémolytiques, et insistent sur la colimétrie.

En 1955, l'O. M. S. et la F. A. O. publient conjointement une monographie sur la pasteurisation du lait (168) et souhaitent l'élaboration d'une législation sur la pasteurisation du lait adaptée à chaque pays, selon le degré de son évolution technologique, en conseillant la recherche des bactéries appartenant au groupe "coli-aerogenes". La même année, THIEULIN (334) pose le problème du lait hygiénique et les services sanitaires de la Seine, sous la plume de THIEULIN et BASILLE (335) (336), publient "Le contrôle sanitaire du lait" : ils conseillent l'épreuve de la phosphatase selon la technique d'ASCHAFFENBURG et MUELLEN (335) et rendent compte des résultats expérimentaux concernant d'une part la recherche des germes "coliformes", "indologènes", "sulfhydrogènes", "colibacilles", et d'autre part le dénombrement des germes aérobies mésophiles (336) dans le lait pasteurisé.

Le 21 mai 1955 paraît le décret n° 55 - 771 relatif aux laits destinés à la consommation humaine (165) qui constitue la législation en vigueur pour le contrôle bactériologique du lait pasteurisé conditionné : l'article 10 du titre II de ce décret stipule que "le lait pasteurisé conditionné, jusqu'au moment de la vente au consommateur, doit présenter une réaction négative lors de la recherche des bactéries

indologènes dans un centimètre cube, ne pas renfermer plus de 30 000 germes microbiens par centimètre cube".

Par ailleurs, l'article 2 du décret n° 65-862 (165) du 9 octobre 1965, déterminant les conditions de production et de mise en vente d'un "lait pasteurisé de haute qualité" définit des normes bactériologiques pour le contrôle d'un tel lait : ce lait ne doit pas contenir :

" 1) plus de 1 coliforme par millilitre à la fin du conditionnement ;

2) plus de 10 coliformes par millilitre lors de la remise au consommateur ;

3) plus de 30 000 germes aérobies mésophiles par millilitre".

La législation exige donc, pour le lait pasteurisé conditionné, la recherche de germes indologènes dans 1 millilitre, pour le lait pasteurisé de haute qualité, le dénombrement des coliformes dans 1 millilitre, et dans les deux cas, le dénombrement des colonies de germes aérobies mésophiles provenant de la mise en culture de 1 millilitre de lait.

Responsable du laboratoire de microbiologie de l'Ecole de Laiterie de Nancy, laboratoire agréé par le service de la Répression des Fraudes pour le contrôle bactériologique des laits pasteurisés conditionnés, surprise et étonnée, au cours de plusieurs années, que le nombre d'échantillons recélant des germes indologènes demeure toujours important malgré les interventions auprès des industriels et les améliorations apportées dans les ateliers de pasteurisation, nous nous proposons à la fin de l'année 1966 d'entreprendre l'étude de la flore bactérienne indologène aéro-anaérobie des laits pasteurisés conditionnés en Meurthe-et-Moselle, sur un nombre d'échantillons suffisamment important afin que l'interprétation des résultats soit statistiquement valable.

Donc, après avoir soumis les échantillons au contrôle bactériologique "officiel" associé à la recherche et au dénombrement des coliformes dans 1 millilitre, nous effectuons l'isolement et l'identification des souches bactériennes indologènes et des souches de "présumés coliformes" à partir des laits dont la culture présente une réaction positive lors de la recherche de l'indole.

A la lumière des résultats obtenus nous sommes amenée à rappeler la position systématique des coliformes et des Entérobactéries, à étudier, préciser et déterminer, dans la mesure du possible, la taxonomie des Aeromonas, bactéries jusque là ignorées dans les laits pasteurisés conditionnés.

L'étude statistique de la flore indologène nous permet alors de connaître la fréquence de la contamination par Aeromonas, et de comparer les contaminations par Aeromonas et les Entérobactéries indologènes ; de plus, elle nous fournit des arguments dans l'interprétation de la présence d'Aeromonas dans les laits pasteurisés conditionnés.

Enfin l'étude du système enzymatique coagulant et protéolytique chez une des souches d'Aeromonas isolées peut témoigner de l'importance de ce type de bactérie en technologie laitière.

La composition des milieux de culture utilisés et la description détaillée des techniques mises en oeuvre au cours de notre travail ne sont pas mentionnées dans notre texte dans la mesure où quiconque peut les retrouver dans le Manuel de Techniques Bactériologiques de BUTTIAUX, BEERENS et TAQUET (36). Par contre, les milieux de culture et techniques ne figurant pas dans ce manuel sont décrits en annexe et codés dans notre texte (A1) ... (A2) ... etc.

EVALUATION DE LA QUALITE DES LAITS PASTEURISES

II - EVALUATION DE LA QUALITE DES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Les échantillons

Les échantillons, qui constituent notre matériel d'étude, sont des laits pasteurisés conditionnés qui ont subi un traitement thermique dit de "Pasteurisation Haute". Le conditionnement de ces laits est divers : carafe de verre, carton paraffiné ou revêtu d'un mince film de matière plastique. Les échantillons, prélevés en chambre froide (4°C à 6°C) cinq à six heures après traitement, sont acheminés vers le laboratoire, conservés en récipient isotherme à 1°C .

507 échantillons nous sont ainsi parvenus, provenant des différents ateliers de pasteurisation de Meurthe-et-Moselle.

1.2. Contrôle de la pasteurisation

Le contrôle de la pasteurisation ou contrôle indirect du degré de chauffage du lait s'effectue par la recherche de deux enzymes naturellement présentes dans le lait cru, peroxydase et phosphatase.

La peroxydase est inactivée lorsqu'elle est portée à une température supérieure à 80°C : son absence dans le lait pasteurisé

conditionné témoigne d'un traitement thermique supérieur à 80° C ; sa recherche est simple et nous l'effectuons conformément à la technique décrite dans le texte officiel concernant le contrôle des laits pasteurisés conditionnés (165).

La phosphatase est inactivée lorsqu'elle est soumise à une température supérieure à 60° C : l'absence de cette enzyme dans le lait pasteurisé conditionné permet de penser que le traitement thermique subi par le lait est tel qu'il a éliminé les microorganismes thermolabiles, et plus particulièrement les germes pathogènes. La législation exige l'absence de phosphatase dans les laits pasteurisés. Nous la recherchons selon la technique d'ASCHAF-FENBURG et MUELLEN (165).

1.3. Contrôle bactériologique

Nous l'effectuons conformément à la législation en vigueur (165) en lui adjoignant une recherche supplémentaire, celle des bactéries dites "coliformes".

1.3.1. Législation en vigueur (165)

1.3.1.1. Dénombrement des colonies de germes aérobies mésophiles ("Dénombrement microbien" du texte officiel)

"Le flacon contenant l'échantillon du lait à étudier est extrait de son emballage isotherme immédiatement avant d'effectuer les dilutions. Il est agité pendant dix secondes au moins.

1 ml du lait ainsi préparé est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile en ayant soin de ne pas plonger la pipette plus de 1 à 2 cm dans le lait. Le lait est ainsi aspiré et refoulé au

moins une fois dans la pipette avant d'effectuer le prélèvement.

La prise d'échantillon est introduite aseptiquement dans un tube contenant 9 ml d'eau stérile salée à 8 ou 9 pour mille. La pipette ne doit pas entrer en contact avec le liquide de dilution.

Le tube est agité doucement pour rendre la dilution homogène.

Après avoir aspiré et refoulé le mélange au moins une fois, 1 ml de la première dilution au 1/10 est prélevé à l'aide d'une nouvelle pipette stérile de 1 ml plongeant de 1 à 2 cm dans le liquide.

Le ml de dilution est introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau salée stérile en prenant les mêmes précautions que ci-dessus.

Une troisième opération est effectuée de la même manière afin d'obtenir une dilution à 1/1 000.

Les ensemencements sont effectués simultanément sur deux boîtes de Pétri.

1 ml de la dilution retenue pour l'examen est prélevé à l'aide d'une pipette stérile de 1 ml et introduit aseptiquement au centre d'une boîte de Pétri stérile.

10 ml environ du milieu gélosé, totalement liquéfié au bain-marie bouillant, puis refroidi à 48°C environ, sont versés dans la boîte de Pétri ayant reçu immédiatement auparavant 1 ml de dilution.

Il ne doit pas s'écouler plus de quinze minutes entre le moment où le lait est dilué et celui où la gélose est introduite dans la boîte de Pétri.

Le mélange de l'inoculum et du milieu de culture est réalisé immédiatement par agitation horizontale.

Les boîtes sont laissées au repos pendant une heure environ, puis retournées au moment d'être introduites dans l'étuve, afin d'éviter les condensations sur le couvercle.

L'incubation à l'étuve est réalisée à la température de 31°C avec une tolérance de 1° C en plus ou moins. La durée d'incubation est de soixante douze heures".

1.3.1.2. Recherche des germes indologènes

"A partir des trois dilutions en eau salée stérile (au 1/10, 1/100, 1/1 000) préparées en vue du dénombrement microbien, porter respectivement 1 ml (c'est-à-dire 1/10, 1/100, 1/1 000 de ml de lait) dans trois tubes d'eau peptonée (E.P.) stérile.

Si l'on désire vérifier l'absence de tout germe indologène dans 1 ml de lait, porter, en outre, 1 ml de lait lui-même dans un ballon de 100 ml environ, contenant au moins 60 ml de la même eau peptonée.

Après quarante-huit heures de séjour à l'étuve à 37° C, rechercher la formation d'indole en ajoutant dans chaque tube environ 0,5 ml du réactif d'EHRlich-KOVACS : l'apparition d'un anneau de coloration rouge vif à la surface de culture témoigne de la présence d'indole (réaction positive). Dans le cas du ballon, verser quelques millimètres de la culture de quarante huit heures dans un tube à essais et procéder comme il vient d'être dit. Si, dans ce cas, la réaction de l'indole est négative, il est indiqué de repiquer 1/10 de millilitre de la culture dans un tube d'eau peptonée, qui sera placé à l'étuve à 37° C, pendant quarante huit heures ; après ce délai, on recherchera l'indole.

Dans tous les cas, examiner d'abord la culture contenant la dilution de lait la plus grande (tube au 1/1 000), puis celle contenant la dilution au 1/100 et ainsi de suite. En opérant dans cet ordre, le premier tube positif indique l'ordre de grandeur du nombre des indologènes (plus de 1 000, entre 100 et 1 000, entre 10 et 100, entre 1 et 10, moins de 1."

1.3.2. Recherche et dénombrement des bactéries coliformes

Parmi les milieux de culture dont disposent les bactériologistes pour mettre en évidence les coliformes, nous choisissons, comme milieu liquide, le milieu lactosé bilié au vert brillant * en tubes de Durham, et comme milieu solide le désoxy-cholate - lactose - agar * car les plus utilisés en France et conseillés par la Fédération Internationale de Laiterie (240).

Culture sur milieu lactosé bilié au vert brillant (V. B.)

1 ml de lait est inoculé dans 20 ml de V. B. en tubes de 200 x 20 mm.

1 ml de la dilution 10-1 est inoculé dans 10 ml de V. B. en tubes de 160 x 16 mm.

Les cultures sont effectuées à 30° C pendant 48 heures.

Culture sur milieu désoxycholate lactose agar (D. L. A.)

1 ml de lait est placé dans une boîte de Pétri et le D. L. A. coulé en double couche.

24 heures, au maximum, d'incubation à 30° C suffisent pour dénombrer les colonies issues des bactéries coliformes.

1.4. Acidité Dornic

Cette acidité de titration est évaluée sur chaque échantillon dans des conditions rigoureuses (A1). Malgré les critiques que l'on peut élever à l'encontre de la titration de l'acide lactique par la technique de DORNIC, elle nous permet de savoir si nos échantillons sont le siège ou non d'une fermentation lactique.

* Celui que nous utilisons provient de chez DIFCO.

2. RESULTATS

Contrôle de la pasteurisation

Sur aucun des échantillons contrôlés nous ne mettons en évidence de peroxydase ou de phosphatase, ce qui nous permet d'affirmer que le traitement thermique subi par ces laits est celui de la pasteurisation haute. Ces résultats laissent supposer que toute bactérie dangereuse est éliminée.

Dénombrement des colonies de germes aérobies mésophiles

"La numération microbienne est exprimée par la moyenne arithmétique des nombres de colonies décomptables à la loupe sur les deux boîtes de Pétri ensemencées chacune avec la dilution convenable du lait à étudier" (165). Nous retenons les chiffres compris entre 30 et 300.

La législation exige que le lait pasteurisé conditionné ne renferme "pas plus de 30 000 germes microbiens" par millilitre.

Sur 507 échantillons, 157 présentent un dénombrement supérieur à $3 \cdot 10^4$ /ml (tableau I).

Tableau I

Dénombrement des colonies de germes aérobies mésophiles

Nombre d'échantillons	N (nombre de colonies/ml)
157	$N > 3 \cdot 10^4$
350	$N \leq 3 \cdot 10^4$

Mise en évidence des "germes indologènes"

Les résultats fournis par la méthode de recherche des indologènes préconisée par la législation sont consignés dans le tableau II.

Tableau II
Indologènes

I (indologènes par ml)	$I < 1$	$I \geq 1$
Nombre d'échantillons	219	288

288 échantillons sont donc contaminés par des germes indologènes.

Mise en évidence et dénombrement des coliformes

Sur milieu V. B. : nous considérons les tubes de V. B. présentant un trouble accompagné ou non de production de gaz, comme susceptibles de correspondre à une culture de coliformes.

Sur milieu D. L. A. : nous dénombrons les colonies d'aspect rouge vineux d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm.

Le tableau III rend compte des résultats obtenus.

Tableau III

Coliformes

Milieux		Nombre d'échantillons
V. B. (+ = trouble) (- = pas de culture)	+	329
	-	178
D. L. A. (C = coliformes/ml)	C = 0	199
	$C \leq 10$	148
	$C > 10$	160

Les résultats globaux concernant le contrôle bactériologique des 507 échantillons de lait pasteurisé conditionné sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV
Résultats globaux

<u>Résultats des cultures</u>			Nombre d'échantillons		Total	
I = culture sur E.P.			350	157		507
+ = au moins 1 par ml						
- = 0 par ml (D.L.A.)						
- = moins de 1 par ml			N 3.10 ⁴ /ml	N 3.10 ⁴ /ml		
(E.P. et V.B.)						
Indologènes		Coliformes				
I -	V.B. -	D.L.A. -	94	25	119	
I -	V.B. +	D.L.A. +	35	20	55	
I -	V.B. +	D.L.A. -	21	11	32	
I -	V.B. -	D.L.A. +	9	4	13	
			159	60	219	
I +	V.B. +	D.L.A. +	135	90	225	
I +	V.B. +	D.L.A. -	17	0	17	
I +	V.B. -	D.L.A. -	27	4	31	
I +	V.B. -	D.L.A. +	12	3	15	
			191	97	288	

D'après les résultats obtenus, et nous référant à la législation, "moins de 3.10^4 germes aérobies mésophiles dans un millilitre et absence de germes indologènes dans un millilitre", nous observons que 348 échantillons sur 507 ne sont pas conformes au décret en vigueur : 288 contiennent des indologènes et parmi les 219 sans indologènes, 60 recèlent plus de 3.10^4 germes vivants aérobies mésophiles dans un millilitre.

Si nous considérons le dénombrement des coliformes sur D. L. A. et si nous adoptons comme critère de qualité bactériologique l'absence de coliformes dans un millilitre, nous constatons que 308 échantillons sont contaminés par des coliformes (présumés) ; mais le nombre d'échantillons contaminés par des coliformes s'avère encore plus important si nous considérons les cultures sur V. B. : dans ce cas c'est 329 échantillons qui se trouvent contenir des coliformes.

A première vue, le nombre d'échantillons contaminés par des coliformes paraît plus élevé par culture sur V. B. : nous verrons dans la discussion si cette impression se confirme ou pas. De même nous voyons que l'épreuve du dénombrement des coliformes est plus sévère que celle des indologènes, ce qui est conforme aux résultats obtenus en notre laboratoire (D. E. S. non publié) il y a quelques années et aux études faites par BASILLE et THIEULIN (14), MILHAUD (228) et MOUCHET (235).

Si nous prenons en considération non seulement les coliformes mais aussi N, nous nous apercevons que le nombre d'échantillons non conformes est de 348 dans le cas où C est égal ou supérieur à 1 sur D. L. A. et de 365 dans le cas où C est égal ou supérieur à 1 sur V. B.

Dans le tableau V, nous donnons les résultats en pourcentages avec les limites de l'intervalle de confiance pour un coefficient de sécurité de 95 % (204).

Tableau V
Résultats en pourcentages

Résultats obtenus		Pourcentages observés	Limites de l'intervalle de confiance des pourcentages pour une sécurité de 95 % p = pourcentage
E. P.	I+	56,8	$52,4 < p < 61,2$
	$I+ ; N > 3.10^4$	68,6	$64,4 < p < 72,7$
D. L. A.	$C \geq 1$	60,7	$56,3 < p < 64,9$
	$C \geq 1 ; N > 3.10^4$	68,6	$64,4 < p < 72,7$
V. B.	$C \geq 1$	64,8	$60,6 < p < 69,1$
	$C \geq 1 ; N > 3.10^4$	72	$67,9 < p < 75,9$

L'acidité Dornic des 507 échantillons contrôlés varie de 16 à 18° D : en aucun cas nous n'observons une acidité de titration anormale ; ceci permet de penser qu'il n'y a pas de prolifération bactérienne entraînant la transformation du lactose en acide lactique.

III - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION
DES FLORES BACTERIENNES,
INDOGENE AERO-ANAEROBIE
ET COLIFORME, A PARTIR DES
288 ECHANTILLONS CONTAMINES
PAR DES BACTERIES INDOGENES.

1. METHODE

1.1. Isolements

1.1.1. A partir des cultures sur V. B., avec ou sans production de gaz, un isolement est effectué :

- sur milieu gélosé lactosé au pourpre de bromocrésol (G. P. B.) ;
- sur milieu désoxycholate-citrate-lactose-agar (D. C. L.).

MILIEU G. P. B. : ce milieu, non inhibiteur, permet
.....
la croissance non seulement des Enterobacteriaceae mais aussi d'autres bactéries qui dégradent ou non le lactose.

MILIEU D. C. L. : milieu sélectif, inhibiteur des bactéries Gram-positives, permettant le développement de Salmonella et Shigella, mais aussi de Proteus : bien souvent les coliformes y prolifèrent malgré la forte concentration en désoxycholate.

Après 24 à 48 heures d'incubation à 30° C, chaque type de colonie bactérienne isolée est retenu et ensemencé sur milieu gélosé nutritif incliné (G. N.) pour conserver la souche, et sur E. P. pour mettre en évidence la production ou non d'indole après 48 heures

d'incubation à 30° C. Une étude des souches isolées sur D. C. L. est faite sur G. P. B.

Donc nous savons si les souches bactériennes isolées à partir des cultures sur V. B. sont ou non indologènes et dégradent ou non le lactose sur G. P. B.

1.1.2. A partir des cultures sur D. L. A.

Toute colonie bactérienne qui s'est développée sur D. L. A. sous forme circulaire, d'un rouge vineux, dont le diamètre est de l'ordre de 0,5 mm, est prélevée etensemencée dans 10 ml d'E. P.. Après 48 heures d'incubation à 30° C, la recherche de l'indole est effectuée sur 5 ml de culture et un réisolement est effectué sur G. P. B. : cela nous permet de savoir si parmi les coliformes "présumés" ayant cultivé sur D. L. A. il en est qui sont indologènes. Toutes les souches ainsi isolées sont conservées sur G. N., qu'elles soient ou non indologènes.

1.1.3. A partir des cultures en E. P. présentant une réaction positive lors de la recherche de l'indole, un isolement est effectué sur G. P. B. et sur Tryptone glucose agar (T. A.) : après 24 à 48 heures d'incubation à 30° C, toute colonie bactérienne isolée estensemencée sur G. N. et E. P., et ne sont conservées que les souches indologènes ; les souches indologènes isolées sur T. A. sont étudiées sur G. P. B. pour connaître leur comportement à l'égard du lactose.

1.2. Identifications

Nous savons que les souches obtenues à partir des 288 échantillons contaminés en "indologènes" sont d'une part des "coliformes présumés" ou autres Enterobacteriaceae, et d'autre part des bactéries indologènes dégradant ou non le lactose. Ceci permet

une certaine orientation de nos recherches et par là même conditionne les épreuves auxquelles nous soumettons les souches pour déterminer leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les souches isolées sont conservées sur G. N. entre 2 et 4° C : au moment de leur identification, elles sont revivifiées et testées de façon à vérifier si elles sont pures, par passage sur B. N. et G. P. B., et trois tubes de G. N. sont ensemencés : après 18 à 24 heures d'incubation à 30° C, une culture est conservée, les deux autres sont utilisées, l'une pour effectuer des épreuves extemporanées, l'autre pour faire une série d'ensemencements permettant d'observer un certain nombre de caractères.

Dans tous les tests auxquels sont soumises nos souches, nous utilisons, comme référence, des souches bactériennes connues.

1.2.1. Epreuves extemporanées effectuées sur toutes les souches

La coloration de Gram modifiée par BURKE-KOPELOV (A2) nous permet de faire entrer nos souches dans la catégorie soit des Gram-positives soit des Gram-négatives.

Recherche de la catalase

Enzyme capable de libérer l'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène, la catalase existe chez de nombreuses bactéries aérobies et aéro-anaérobies. Les souches de référence utilisées sont Streptococcus faecalis et E. coli.

Recherche de la cytochrome-oxydase

Cette enzyme qui assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit est présente chez les bactéries aérobies strictes, mais certaines bactéries aéro-anaérobies peuvent aussi la posséder. La technique utilisée est celle d'Ewing et Johnson. Les souches de référence utilisées sont Pseudomonas fluorescens et E. coli.

Recherche de l'oxydase

Enzyme qui intervient dans l'oxydation du substrat par l'oxygène moléculaire, l'oxydase est mise en évidence selon la technique de KOVACS, en utilisant comme référence Pseudomonas fluorescens et E. coli.

1.2.2. Etude des souches possédant une catalase mais ----- dépourvues de cytochrome-oxydase et oxydase -----

1.2.2.1. Inoculation du milieu de KLIGLER

Les souches sont ensemencées sur milieu de KLIGLER : ce milieu gélosé, lactosé et glucosé dans lequel la phénolsulfonephtaléine permet de mettre en évidence le virage du rouge au jaune s'il y a production d'hydrogène sulfuré par la bactérie, peut être transformé en sulfure de fer noir. Le milieu, en tube de 160 x 16 mm doit présenter une butte (ou culot) et une tranche : la technique d'ensemencement doit être rigoureusement respectée : une strie rectiligne sur la tranche, une piqûre dans la butte.

La culture sur un tel milieu permet de juger du pouvoir glucidolytique de la souche inoculée, et éventuellement de la production d'hydrogène sulfuré.

Le temps d'incubation à 30°C ne doit pas dépasser 24 heures.

Pour les souches ne dégradant pas le lactose, la recherche de la β .galactosidase est effectuée selon la technique de LE MINOR et BEN HAMIDA (201).

1.2.2.2. Tests auxquels sont soumises les souches possédant ou non une β .galactosidase

Tests "I. M. V. I. C." :

A partir de la culture sur milieu de KLIGLER les souches sont soumises aux tests "I. M. V. I. C." :

- Culture en E.P. pour rechercher la production d'indole après incubation à 30°C pendant 48 heures (330) (331).

- Culture sur milieu de FOUAD (108) à l'extrait de levures (10/00) qui permet de mettre en évidence les produits issus de la dégradation du glucose après 4 jours d'incubation à 30°C, par utilisation, d'une part d'une solution de rouge de méthyle, d'autre part par application de la réaction d'O'MEARA.

- Culture sur milieu de SIMMONS : dans ce milieu gélosé entièrement synthétique qui contient du citrate de sodium et du phosphate d'ammonium, l'indicateur coloré, le bleu de bromothymol, vire du vert au bleu, s'il y a alcalinisation. Ne peuvent cultiver sur ce milieu que les bactéries capables d'utiliser le citrate (332) comme seule source de carbone, et le phosphate d'ammonium comme seule source d'azote. Les cultures sont observées après incubation à 30°C de 24 heures en 24 heures, pendant une semaine.

- Mobilité :

L'inoculation d'un milieu peptoné gélosé à 50/00, en piqûre, sur un culot de 4 cm environ permet, après incubation à 30°C pendant une semaine, en observant de 24 heures en 24 heures, d'évaluer la mobilité.

- Réduction du nitrate en nitrite :

L'inoculation abondante d'un milieu gélosé nitraté incliné permet, après 24 heures d'incubation à 30°C de rechercher la réduction du nitrate en nitrite par addition d'une solution d'acide sulfanilique et d' α .naphtylamine.

- Décarboxylation de la lysine (326)

L'ensemencement d'un milieu au monochlorhydrate de L-lysine, selon la technique de TAYLOR, à 37°C pendant 24 à 48 heures, permet de mettre en évidence la transformation de la lysine en cadavérine qui se manifeste par une alcalinisation du milieu.

- Culture en présence de KCN

L'incubation à 37°C pendant 24 heures au plus des souches ensemencées, selon la technique de BUTTIAUX, témoigne de leur possibilité ou non de croître en présence de KCN.

- La dégradation de la gélatine :

Elle est étudiée à la fois sur milieu à la gélatine en tube et selon la technique de FRAZIER après incubation à 30°C pendant 4 jours.

- L'étude des fermentations sucrées :

Elle est effectuée sur milieu liquide en tubes de Durham. Les sucres étudiés sont : glucose, lactose, saccharose, mannitol, maltose ; l'indicateur de pH dans ce milieu est la phénolsulfonephthaléine : l'observation des cultures, incubées à 30°C, se fait de 24 heures en 24 heures pendant 1 semaine : le virage du rouge au jaune, accompagné ou non de production de gaz, témoigne de la dégradation du sucre étudié.

1.2.2.3. Tests auxquels sont soumises les souches dépourvues de β .galactosidase

Ces souches sont soumises à deux épreuves permettant de mettre en évidence d'une part la présence d'une uréase, d'autre part la désamination de la d.l. phénylalanine en acide phénylpyruvique.

- Inoculation du milieu de CHRISTENSEN :
.....

Ce milieu gélosé peptoné glucosé à l'urée dans lequel l'indicateur coloré est la phénolsulfonephtaléine, doit présenter une tranche et une butte, mais l'ensemencement ne se fait que sur la tranche. Après incubation à 37°C pendant 1 à 6 jours, l'utilisation de l'urée se manifeste par une alcalinisation du milieu qui vire au rouge.

- Inoculation d'un milieu à la d. l. phénylalanine :
.....

Ce milieu gélosé peptoné à l'extrait de levures additionné de d. l. phénylalanine permet d'observer la transformation en acide phénylpyruvique (A.P.P.) après 24 heures à 37°C, par addition d'une solution d'alun de fer en présence de sulfate d'ammonium : l'acide phénylpyruvique en présence de ces réactifs donne une coloration vert épinard caractéristique.

1.2.3. Etude des souches possédant catalase, cytochrome
oxydase et oxydase

Type respiratoire :
.....

La mise en culture sur milieu viande-levure (V.L.) gélosé à 2 0/00 en tube de 180 x 8 mm pendant 24 à 48 heures à 30°C permet de définir le type respiratoire.

La dégradation du glucose par oxydation ou
.....

fermentation est étudiée selon la technique de
.....

HUGH et LEIFSON après incubation à 30°C pendant 48 heures (159)

Compte-tenu des résultats obtenus, les souches sont inoculées sur milieu de KLIGLER (p. 20) et la β .galactosidase recherchée si nécessaire.

Ces souches sont ensuite soumises aux tests "I. M. V. I. C." et la réduction du nitrate en nitrite étudiée (p. 21).

Après avoir exalté la mobilité par deux passages successifs sur milieu nutritif gélosé à 5 0/00, une coloration de cils est effectuée selon la technique de LEIFSON.

La production d'hydrogène sulfuré est étudiée en effectuant une culture sur milieu liquide peptoné cystiné au citrate de fer ammoniacal (A_3) dans la mesure où l'apparition de sulfure de fer sur milieu de KLIGLER a pu être entravée par l'acidification provoquée par la fermentation des sucres : l'observation de la culture de 24 heures en 24 heures à 30°C pendant 7 jours permet de savoir si la souche est sulfhydrogène ou non.

L'étude des fermentations sucrées est effectuée sur milieu liquide en tubes de Durham. Les sucres testés sont les suivants : adonitol, amidon, arabinose, cellobiose, dulcitol, fructose, galactose, glucose, glycérol, glycogène, inositol, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, saccharose, salicine, sorbitol, sorbose, tréhalose, xylose.

Les résultats sont notés après incubation à 30°C de 24 heures à 4 semaines.

Des milieux gélosés à l'amidon, au lait, à la gélatine, à la lécithine coulés en boîtes de Pétri sontensemencés

en piqûre à raison de 4 souches par boîte pour tester, par hydrolyse des différents constituants, la présence éventuelle d'amylase, caséinase, gélatinase et lécithinase. L'observation des cultures incubées à 30°C se fait de 24 heures en 24 heures en ce qui concerne la caséine et la lécithine; quant à l'hydrolyse de l'amidon elle est révélée par l'éthanol à 95° et celle de la gélatine, selon la technique de FRAZIER, après incubation à 30°C pendant 4 jours.

L'étude de l'utilisation des acides aminés comme seule

 source de carbone (296) se fait par culture sur milieu synthétique;
 trois acides aminés sont testés : L-arginine, L-asparagine et
 L-histidine (A4).

La recherche de la déshydrogénase responsable de la

 transformation du 2-3 butanediol en acétoïne se fait

 selon la technique proposée par SCHUBERT (288) (A5).

L'hémolyse est recherchée sur milieu gélosé additionné

 de sang de mouton.

2. RESULTATS

2.1. Isolements

2.1.1. Les colonies isolées sur D.C.L. (48)

 revêtent trois aspects différents .

- des colonies de 1,5 à 2 mm de diamètre, légèrement convexes, rouges, dont le contour laisse apparaître un liseré transparent plus ou moins important.

- des colonies de 1 à 2 mm de diamètre légèrement rosées, lisses, brillantes.

- des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, rouges, fortement convexes.

Ces observations nous amènent à supposer qu'il s'agit de colonies de coliformes pour celles qui sont rouges et d'autres Entérobactéries pour les colonies légèrement rosées.

Ces colonies cultivées ensuite sur E.P. et G.P.B. se retrouvent dans les résultats fournis dans le tableau VI.

2.1.2. Les colonies isolées sur G.P.B. se révèlent sous
deux aspects :

- de grosses colonies à contour plus ou moins précis parce que "œulantes", muqueuses, opaques, d'un diamètre supérieur à 2 mm et faisant virer le pourpre de bromocrésol au jaune qui orientent vers le diagnostic de Klebsiella Enterobacter.

- des colonies à contour net, plus ou moins transparentes, dont le diamètre est de l'ordre de 1 à 1,5 mm faisant virer ou non le pourpre de bromocrésol.

Le virage au jaune du pourpre de bromocrésol correspond à l'utilisation du lactose par la bactérie.

La culture sur E.P. de toutes les souches isolées soumise au réactif d'EHRlich KOVACS nous dévoile le caractère indologène ou non.

Ces premiers résultats concernant toutes les souches isolées sont donnés dans le tableau VI.

Tableau VI

Résultats de l'utilisation du lactose sur G.P.B. et de la production d'indole sur E.P.

Résultats des caractères étudiés	L + I +	L + I -	L - I +	L - I -
Nombre de souches	914	1 386	97	0

L + = dégradation du lactose I + = indologène
L - = pas de dégradation du lactose I - = anindologène

2 397 souches sont donc isolées :

- 914 dégradent le lactose et sont indologènes,
- 1 386 dégradent le lactose et sont anindologènes.
- 97 ne dégradent pas le lactose et sont indologènes.

2.2. Identification des 2 397 souches isolées

Le tableau VII rend compte des résultats des épreuves extemporanées effectuées sur les souches.

Tableau VII

Résultats des épreuves extemporanées

Epreuves	Gram		Catalase		Cytochrome oxydase		Oxydase	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Nombre de souches	0	2 397	2 397	0	591	1 806	591	1 806

Tenant compte de ces résultats nous essayons de déterminer d'une part les souches possédant une catalase, mais dépourvues de cytochrome - oxydase et oxydase, et d'autre part les souches possédant catalase, cytochrome -oxydase et oxydase.

2.2.1. Détermination des souches possédant une catalase et dépourvues de cytochrome-oxydase et d'oxydase

Etant donné que ces souches proviennent des cultures sur V.B. et D.L.A., il est probable que nous nous trouvons en présence de bactéries coliformes.

2.2.1.1. Position taxonomique des coliformes

Incluses dans la famille des Enterobacteriaceae, les bactéries coliformes correspondent à quatre genres de la tribu des Escherichiae dans la classification américaine de BERGEY (22).

Tribu des Escherichieae (BERGEY, BREED et MURRAY 1938)

<u>Genres</u>	<u>Espèces</u>
<u>Escherichia</u>	(<u>Escherichia coli</u> (MIGULA, 1895)
	) CASTELLANI et CHALMERS,
	(1919
	) <u>Escherichia aurescens</u> (PARR, 1937)
	(MALLIGO et coll. 1955
	) <u>Escherichia freundii</u> (BRAAK, 1928)
	(YALE, 1939
	) <u>Escherichia intermedia</u> (WERKMAN
	(et GILLEN, 1932) VAUGHN et
	) LEVINE 1942

<u>Aerobacter</u>	(	<u>Aerobacter aerogenes</u> (KRUSE, 1896)
	)	BEIJERINCK, 1900
	(	<u>Aerobacter cloacae</u> (YORDON, 1890)
	)	BERGEY et coll., 1923
<u>Klebsiella</u>	(	<u>Klebsiella pneumoniae</u> (SCHROETER,
	)	1886) TREVISAN, 1887
	(	<u>Klebsiella ozaenae</u> (ABEL, 1893)
	)	BERGEY et coll., 1925
<u>Paracolobactrum</u>	(	<u>Klebsiella rhinoscleromatis</u> TREVISAN,
	)	1887
	(	<u>Paracolobactrum aerogenoides</u> BORMAN
	)	et coll., 1944
	(	<u>Paracolobactrum intermedium</u> BORMAN
	)	et coll., 1944
	(	<u>Paracolobactrum arizonae</u> KAUFFMAN,
	)	1940
	(	<u>Paracolobactrum coliforme</u> BORMAN
	)	et coll., 1944

En 1963, EWING (97') propose une nouvelle classification des Enterobacteriaceae telle que les bactéries coliformes se trouvent dispersées dans différentes tribus et ne se retrouvent plus dans la seule tribu des Escherichieae.

EWING, dans la famille des Enterobacteriaceae RAHN, 1937, reconnaît quatre tribus et les bactéries coliformes se répartissent de la façon suivante :

Escherichia coli (MIGULA, 1895) CASTELLANI et CHALMERS, 1919 se retrouve dans la tribu des Escherichieae BERGEY, BREED et MURRAY, 1938.

Citrobacter WERKMAN et GILLEN, 1932, constitue le troisième genre de la tribu des Salmonelleae BERGEY, BREED et MURRAY, 1938.

Klebsiella TREVISAN, 1885, et Enterobacter HORMAECHE et EDWARDS, 1960, sont les deux genres de la tribu des Klebsielleae TREVISAN, 1885.

Dans notre travail, nous adoptons les dénominations retenues dans le manuel de BUTTIAUX, BEERENS et TACQUET (36) auquel nous nous référons pour nos identifications, et qui sont conformes dans l'ensemble à la nomenclature de EWING.

Escherichia coli (MIGULA, 1895) CASTELLANI et CHALMERS, 1919 et sa variété lactose + lent.

Citrobacter intermedium (WERKMAN et GILLEN, 1932) et sa variété lactose + lent.

Citrobacter freundii (BRAAK, 1928) WERKMAN et GILLEN, 1932 et sa variété lactose + lent (BETHESDA).

Enterobacter aerogenes (KRUSE, 1896) HORMAECHE et EDWARDS, 1960.

Enterobacter cloacae (YORDON, 1890) HORMAECHE et EDWARDS, 1960

Klebsiella TREVISAN, 1885

Remarque : dans la famille des Enterobacteriaceae, nous retenons aussi la tribu des Proteae CASTELLANI et CHALMERS, 1919 avec ses deux genres, Proteus HAUSER, 1885 et Providencia KAUFMANN et EDWARDS, 1954.

En nous référant au manuel de BERGEY (22) nous considérons, dans notre travail, les espèces suivantes :

Proteus vulgaris HAUSER, 1885

Proteus mirabilis HAUSER, 1885

Proteus morganii (WINSLOW et coll., 1919) RAUSS, 1936

Proteus rettgeri (HARDLEY et coll., 1918) RUSTIGIAN
et STUART, 1943

Du fait que toutes ces bactéries appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, elles en ont les caractères généraux, à savoir qu'elles se présentent sous forme de bâtonnets courts et trapus pourvus ou non de cils péritriches, ne prenant pas la coloration de Gram; mobiles ou non, elles se développent facilement sur milieux artificiels; elles fermentent le glucose en produisant de l'acide accompagné ou non de gaz; elles sont aéro-anaérobies, mésophiles, sont capables de réduire le nitrate en nitrite; en outre, elles possèdent une catalase mais sont dépourvues de cytochrome-oxydase et d'oxydase.

De plus, les coliformes sont en général capables de dégrader plus ou moins rapidement le lactose, et synthétisent, en présence de lactose, le système enzymatique β .galactosidase.

Par ailleurs, parmi ces bactéries, certaines sont indologènes, c'est-à-dire qu'elles ont le pouvoir de dégrader le tryptophane en indole, pouvoir que possèdent d'autres bactéries n'appartenant pas aux Enterobacteriaceae.

2.2.1.2. Coliformes et autres Enterobacteriaceae isolés des 288 échantillons contaminés par des bactéries indologènes.

L'observation du milieu de KLIGLER après

18 à 20 heures d'incubation à 30°C doit être rigoureuse : ce milieu à base de glucose (10/00) et de lactose (100/00) dans lequel est incorporé un indicateur coloré variant en fonction du pH est riche en source d'azote (200/00 de peptone). Ensemencé en strie rectiligne sur la tranche et en piqure au niveau de la butte, la fermentation du glucose s'observe au niveau du culot, celle du lactose au niveau de la tranche : par production d'acide, l'une et l'autre fermentation entraîne le virage du rouge au jaune. En l'absence de fermentation du lactose, en raison de la faible quantité de glucose contenu dans le milieu (10/00), en regard de l'importance de la source d'azote (200/00), l'utilisation de la source azotée entraîne, en surface, en aérobiose, la formation d'ammoniaque qui masque l'acidité provenant de l'utilisation du glucose; d'où s'il y a fermentation du glucose seul, le culot seul est jaune et la tranche demeure rouge; par contre, si le lactose, dont la proportion dans le milieu est plus importante (100/00), est utilisé, l'acidité produite est telle qu'elle se manifeste au niveau du culot et de la tranche, l'alcalinisation provoquée en aérobiose étant supplantée par l'acidification provenant de la dégradation du lactose, à condition d'observer la culture sur milieu de KLIGLER après 24 heures d'incubation, maximum; au-delà de 24 heures, le même phénomène d'alcalinisation en surface s'établit et fausse les résultats.

Le tableau VIII rend compte des résultats obtenus pour les 1806 souches inoculées sur milieu de KLIGLER, en fonction de la production d'indole (I+) ou non (I-).

Dans le tableau IX sont consignés les résultats des cultures effectuées sur les différents milieux, énoncés dans les paragraphes 1.2.2.2 et 1.2.2.3. pages 21 et 22, qui nous permettent l'identification des 1806 souches.

Tableau VIII

Résultats obtenus sur milieu de Kligler et production ou non d'indole

Résultats sur Kligler	Production d'indole	Nombre de souches	
		I +	I -
	L + G + g + H ₂ S -	384	1 368
	L + G + g + H ₂ S +	0	18
	L - G + g + H ₂ S +	5	0
	L - G + g + H ₂ S -	28	0
	L - G + g - H ₂ S -	3	0
Total		420	1 386

L + = fermentation du lactose
G + = fermentation du glucose
g + = production de gaz
H₂S+ = production de H₂S
I + = production d'indole

L - = pas de fermentation du lactose
G - = pas de fermentation du glucose
g - = pas de production de gaz
H₂S - = pas de production de H₂S
I - = pas de production d'indole

Tableau IX

Identification des 1 806 souches possédant une catalase et dépourvues de cytochrome-oxydase et oxydase

TESTS	EFFECTIF	185	7	472	18	684	69	192	143	2	3	28	3
Indole	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
R. M.	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
V. P.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Citrate (Simmons)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Réduction nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B. galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Urée (Christensen)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Glucose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Lactose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
Maltose	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	-	-
Mannitol	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	-	-	+
Saccharose	++	-	-	-	++	++	++	++	++	-	++	-	+
H ₂ S (Kligler)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Décarboxylation (Lysine)	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
K. C. N.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatine	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
A. P. P.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
DENOMINATION	E. coli	C. intermedium	C. Freundii	E. aerogenes	E. cloacae	Klebsiella	Bethesda	P. vulgaris	P. morganii	Providencia			
Nombre d'échantillons contaminés	64	2	183	5	115	20	74	68	1	1	9	2	

Pour les fermentations sucrées : ++ = acidification et production de gaz

+ = acidification

Pour les autres tests;

+ = test positif

- = test négatif

La lecture de ce tableau nous montre que les 1 806 souches bactériennes étudiées appartiennent toutes à la famille des Enterobacteriaceae et que la plupart d'entre elles sont des coliformes.

Parmi les 185 souches que nous dénommons E. coli, 20 sont atypiques car, ou elles ne produisent pas d'indole ou elles ne donnent pas de gaz lorsqu'elles sont cultivées à 44°C pendant 48 heures sur E.P. et sur V.B.

2.2.2. Détermination des souches possédant une catalase, cytochrome -oxydase et oxydase

591 de nos souches possèdent ces enzymes et sont indologènes.

Les cultures sur milieu V.L. nous révèlent qu'elles sont toutes issues de bactéries aéro-anaérobies.

Les résultats des cultures sur milieu de HUGH et LEIFSON témoignent de leur pouvoir fermentaire, sans exception.

La coloration de cils nous permet de dire que les bactéries observées sont porteuses de cils polaires : nous osons signaler au passage que ces colorations nous ont demandé beaucoup de temps car la technique est délicate et les cils très fragiles.

A partir de ces quelques résultats, nous nous trouvons en présence de bactéries fermentaires, comme les coliformes, mais qui, comme les Pseudomonas, possèdent cytochrome-oxydase, oxydase et cil polaire. La morphologie bacillaire, rectiligne, écarte l'éventualité de souches de Vibrio : il peut donc s'agir d'Aeromonas dont nous allons confirmer le diagnostic.

Mais pour nous permettre de faire l'identification incontestée de nos souches, il est nécessaire de faire une mise au point sur la position systématique des Aeromonas qui nous amènera à nous fonder sur des critères sûrs pour établir le diagnostic de genre et d'espèces avec le maximum de certitude.

2.2.2.1. Position systématique des Aeromonas

Nomenclature : il semble bien que la première description d'Aeromonas remonte à la fin du siècle dernier, bien que la création du genre Aeromonas soit postérieure.

Tandis que ZIMMERMAN en 1890 (363) isole, à partir d'une eau de robinet Bacillus punctatus, SANARELLI en 1891, à partir du sang de grenouille, met en évidence Bacillus hydrophilus fuscus; en 1896 LEHMANN et NEUMANN décrivent une bactérie immobile élaborant un pigment brun hydrosoluble, bactérie qu'ils dénomment Bacterium salmonicida; BEIJERINCK, en 1900, étudiant une bactérie fermentante à cil polaire douée de pouvoir protéolytique, lui attribue le nom d'Aerobacter aerogenes (22).

C'est en 1936 que KLUYVER et VAN NIEL (179) créent le genre Aeromonas en reconnaissant comme espèce type Aeromonas liquefaciens BEIJERINCK 1900. A peu près au même moment, SHERAGO signale une septicémie provoquée chez de jeunes cobayes par Pseudomonas caviae comb. nov. (283); SCHAPERCLAUS quelques années plus tard observe des infections chez la Carpe dues à Pseudomonas punctata. Dès lors, quelques chercheurs s'intéressent à ces bactéries et le nombre de publications concernant les Aeromonas va s'amplifiant. GRIFFIN et coll. (129) définissent l'espèce Bacterium salmonicida, qui devient Aeromonas salmonicida, confirmé par EWING et coll. (100), LECLERC (189), SCHUBERT (287).

L'espèce Proteus hydrophilus responsable du "red-leg" chez la Grenouille, étudiée par KULP et BORDEN (185), GUTHRIE et HITCHNER (137) est assimilée à Aeromonas hydrophila par STANIER (323). MILES et MILES (227) comparant Proteus melanogenes isolé d'oeufs gâtés et Aerobacter liquefaciens provenant de grenouilles atteintes du "red-leg" proposent d'inclure ces deux espèces dans le genre Aeromonas sous le nom d'espèce liquefaciens.

Dans la 7^{me} édition de la classification des bactéries de BERGEY (22) figurent quatre espèces dans le genre Aeromonas :

- 1 - Aeromonas liquefaciens (BEIJERINCK 1900) KLUYVER
et VAN NIEL 1936
- 2 - Aeromonas punctata (ZIMMERMANN 1890) SNIESKO
1957
- 3 - Aeromonas hydrophila (CHESTER 1901) STANIER 1943
- 4 - Aeromonas salmonicida (LEHMANN et NEUMANN 1896)
GRIFFIN 1954

PIVNICK et SABINA (258) étudiant la microbiologie d'émulsions d'huile isolent une bactérie dont les caractères sont comparables à ceux décrits par CRAWFORD (63) concernant Pseudomonas formicans: PIVNICK et SABINA proposent alors de désigner cette bactérie sous le nom d'Aeromonas formicans CRAWFORD 1954. EDDY fait, en 1960-1961, une mise au point sur les Aeromonas (85) (86) et reconnaît trois espèces dans le genre Aeromonas :

Aeromonas liquefaciens (BEIJERINCK 1900) KLUYVER
et VAN NIEL 1936

Aeromonas formicans (CRAWFORD 1954) PIVNICK et
SABINA 1957

Aeromonas salmonicida (LEHMANN et NEUMANN 1896)
GRIFFIN 1954

Au même moment EWING et JOHNSON (100) dénomment les bactéries C₂₇ FERGUSON, Aeromonas shigelloides. LECLERC, étudiant les Aeromonas isolés des eaux (191), reconnaît quatre espèces :

- 1 - Aeromonas hydrophila ssp. formicans (CRAWFORD 1954)
- 2 - Aeromonas dourgesi comb. nov.
Aeromonas dourgesi spp. anaerogenes comb. nov.
- 3 - Aeromonas salmonicida (LEHMANN et NEUMANN 1896) GRIFFIN 1954
- 4 - Aeromonas shigelloides (FERGUSON et HENDERSON 1947) EWING 1960.

Mais en 1964, EDDY et CARPENTER (88) proposent pour les C₂₇ FERGUSON la dénomination Plesiomonas shigelloides et éliminent ainsi l'espèce Aeromonas shigelloides du genre Aeromonas. Après plusieurs années d'étude sur les Aeromonas SCHUBERT (287 291) (297) propose dans le genre Aeromonas trois espèces comprenant des sous-espèces.

L'espèce type devient Aeromonas punctata (ZIMMERMANN 1896) SNIESKO 1957.

- 1 - Aeromonas punctata (ZIMMERMANN 1896) SNIESKO 1957
Aeromonas punctata ssp. caviae (SCHERAGO 1936)
SCHUBERT 1964
- 2 - Aeromonas hydrophila (CHESTER 1901) STANIER 1912

Aeromonas hydrophila ssp. anaerogenes SCHUBERT
1964

Aeromonas hydrophila ssp. proteolytica (MERKEL
et coll. 1964) SCHUBERT 1969

3 - Aeromonas salmonicida (LEHMANN et NEUMANN
1896) GRIFFIN, SNIESKO et FRIDDLE 1953

Aeromonas salmonicida ssp. achromogenes (SMITH
1963) SCHUBERT 1967

Aeromonas salmonicida ssp. masoucida KINURA 1969

Malgré les très importants travaux de SCHUBERT pour essayer de clarifier les problèmes que posent les *Aeromonas* en bactériologie, il faut bien reconnaître que la dénomination de ces bactéries varie avec le pays : aussi nous paraît-il opportun d'essayer de faire la synthèse des différentes dénominations utilisées dans les publications car c'est là une des difficultés à laquelle nous nous sommes heurtée au cours de nos recherches. Nous prenons pour référence les dénominations de SCHUBERT.

1 - Aeromonas punctata (ZIMMERMANN 1890) SNIESKO
1957

Bacillus punctatus ZIMMERMANN 1890

Bacterium punctatum LEHMANN et NEUMANN 1896

Pseudomonas punctata CHESTER 1901

- Aeromonas punctata ssp. caviae (SCHERAGO 1936)
SCHUBERT 1964

Pseudomonas caviae SCHERAGO 1936

Pseudomonas formicans CRAWFORD 1954

Aeromonas formicans (CRAWFORD 1954) PIVNICK
et SABINA 1957

- Aeromonas hydrophila ssp. formicans (CRAWFORD 1954) LECLERC 1962
- 2 - Aeromonas hydrophila (CHESTER 1901) STANIER 1943
- Bacillus hydrophilus fuscus SANARELLI 1891
- Bacterium hydrophilum CHESTER 1901
- Aeromonas liquefaciens (BEIJERINCK 1900) KHUYVER et VAN NIEL 1936
- Proteus hydrophilus BERGEY et coll. 1923
- Proteus melanovogenes MILES et HALNAN 1937
- Aeromonas dourgesi LECLERC 1962
- Aeromonas hydrophila ssp. anaerogenes SCHUBERT 1964
- Aeromonas dourgesi ssp. anaerogenes LECLERC 1962
- Aeromonas hydrophila ssp. proteolytica (MERKEL et coll. 1964) SCHUBERT 1969
- Aeromonas proteolytica MERKEL et coll. 1964
- 3 - Aeromonas salmonicida (LEHMANN et NEUMANN 1896) GRIFFIN et coll. 1953
- Bacterium salmonicida LEHMANN et NEUMANN 1896
- Aeromonas salmonicida ssp. achromogenes (SMITH 1963) SCHUBERT 1967
- Necromonas achromogenes SMITH 1963
- Aeromonas salmonicida ssp. masoucida KINURA 1969

Il convient de signaler qu'il est vraisemblable qu'Aeromonas shigelloides ne figurera plus dans le genre Aeromonas : pour EDDY et CARPENTER (88) il est devenu Plesiomonas shigelloides et pour HENDRIE et coll. (46) il est transféré dans le genre Vibrio.

Si au début de nos recherches nous avons adopté la nomenclature proposée par LECLERC (page 38), dans ce travail nous nous référons à celle de SCHUBERT (page 38).

2.2.2.2. Définition du genre Aeromonas

A partir des résultats des travaux parus depuis une quinzaine d'années, parmi lesquels essentiellement ceux de EDDY (85) (86) (87) (88), EWING (100), LECLERC (189) (191) (193) (195) et SCHUBERT (284) (285) (286) (287) (288) (289) (290) (291) (295) (296) (297) (298) (299), et à partir de nos propres observations, nous pouvons considérer comme appartenant au genre Aeromonas les bactéries présentant en commun un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et écologiques.

- Caractères morphologiques : Aeromonas se présente sous forme de bâtonnet rectiligne, plus ou moins long, mais plus fréquemment du type court, qui ne forme pas de spore, possède un système ciliaire polaire et ne prend pas la coloration de Gram.

- Caractères physiologiques : mobile ou non, Aeromonas est aéro-anaérobie facultatif, mésophile, possédant catalase, cytochrome-oxydase et oxydase.

- Caractères biochimiques : Aeromonas dégrade les hydrates de carbone dans des conditions aérobies et anaérobies avec production d'acide accompagné ou non de la production de gaz (CO_2 ou H_2).

Aeromonas n'utilise pas l'inositol.

Aeromonas élabore amylase, lécithinase, protéinase.

- Caractères écologiques : la majorité des espèces connues proviennent des eaux douce et marine et certaines espèces sont à l'origine d'infections chez les Poïkilothermes.

A cette définition correspondent 591 de nos souches : nous savons déjà qu'elles sont Gram-négatives, qu'elles possèdent un système ciliaire polaire, qu'elles cultivent à 30°C, donc méso-philés, qu'elles possèdent catalase, cytochrome-oxydase et oxydase, qu'elles sont aéro-anaérobies.

Le tableau X rend compte du caractère fermentaire de nos souches sur milieu de KLIGLER.

Tableau X

Résultats des cultures sur milieu de KLIGLER des 591 souches possédant une catalase, cytochrome-oxydase et oxydase

Milieu de Kligler Nombre de souches	Fermentation du lactose	Fermentation du glucose	Production de gaz	Production de H ₂ S
321	+	+	-	-
209	+	+	+	-
32	-	+	-	-
29	-	+	+	-

De plus, aucune de nos souches n'utilise l'inositol (étudiée sur milieu liquide en tube de Durham).

L'étude de la dégradation de l'amidon, du lait, de la gélatine, de la lécithine nous permet d'affirmer que toutes nos souches possèdent amylase, caséinase, gélatinase, lécithinase, mais que ces enzymes sont plus ou moins actives selon les espèces et les souches considérées, comme nous le verrons ultérieurement.

Donc ces bactéries aéro-anaérobies indologènes isolées de nos échantillons de lait pasteurisé conditionné appartiennent bien au genre Aeromonas.

2.2.3. Entérobactéries et Aeromonas isolés des 288 échantillons, sur 507, contaminés par des bactéries indologènes

Les tableaux XI, XII, XIII rendent compte de la flore bactérienne indologène aéro-anaérobie et de la flore coliforme anindologène isolées des 288 échantillons contaminés par des bactéries indologènes.

Tableau XI

Aeromonas (indologène)	Coliformes anindologènes	Nombre d'échantillons
Aeromonas		59
Aeromonas	Citrobacter intermedium	32
Aeromonas	Enterobacter aerogenes	22
Aeromonas	Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes	24
Aeromonas	Klebsiella	1
Aeromonas	Citrobacter freundii, Klebsiella	1
Aeromonas	Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes, Klebsiella	15
Aeromonas	Enterobacter aerogenes, Klebsiella	9
	Total	163

Tableau XII

Bactéries indologènes	Bactéries anindologènes	Nombre d'échantillons
Aeromonas - Klebsiella	Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes	9
Aeromonas - Klebsiella	Citrobacter intermedium, Enterobacter cloacae	6
Aeromonas - Klebsiella	Citrobacter intermedium, Klebsiella	3
Aeromonas - Klebsiella	Citrobacter intermedium,	7
Aeromonas Escherichia coli	Citrobacter intermedium, Klebsiella	7
Aeromonas Escherichia coli	Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes	4
Aeromonas Escherichia coli	Citrobacter intermedium, Enterobacter cloacae	4
Aeromonas, Klebsiella, E. coli	Citrobacter intermedium, Klebsiella	6
Aeromonas, Klebsiella, E. coli	Citrobacter intermedium, Klebsiella, Enterobacter aerogenes	2
Aeromonas, Klebsiella, E. coli	Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes	3
Aeromonas, Providencia	Citrobacter intermedium	1
Aeromonas, Providencia	Enterobacter aerogenes	1
Aeromonas, E. coli, Proteus morgani	Citrobacter intermedium	2
Aeromonas, E. coli, Proteus morgani	Enterobacter aerogenes	1
	Total	56

Tableau XIII

Indologènes	Anindologènes	Nombre d'échantillons
Klebsiella	Citrobacter intermedium, Enterobacter cloacae Citrobacter intermedium, Klebsiella Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes Citrobacter intermedium	4 11 10 6 31
E. coli	Enterobacter aerogenes Enterobacter aerogenes, Klebsiella Citrobacter intermedium, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae Citrobacter intermedium, Klebsiella	3 2 17 4 8
E. coli, Klebsiella	Citrobacter intermedium Enterobacter aerogenes	2 2 4
E. coli, Klebsiella, Proteus morganii	Citrobacter intermedium	2 2
E. coli, Klebsiella, Proteus vulgaris	Klebsiella	1 1
E. coli, Proteus morganii	Citrobacter intermedium Citrobacter intermedium, Klebsiella	2 2 4
Citrobacter intermedium	Enterobacter aerogenes	2 2
Bethesda	Enterobacter aerogenes	1 1
E. coli atypique	Citrobacter intermedium, Enterobacter cloacae Citrobacter intermedium, Enterobacter aerogenes	2 5 7
Total		69

2.2.4. Etude des souches d'Aeromonas isolées

Le tableau XIV rend compte de l'identification des souches d'Aeromonas obtenues à partir des échantillons contaminés par des bactéries indologènes. Les deux colonnes correspondent aux caractères ou tests : S, selon SCHUBERT (285 299), O, selon nos propres observations. La température d'incubation utilisée pour cette étude est celle de 30°C; le choix de cette température repose sur la densité bactérienne obtenue et évaluée au biophotomètre en fonction de la température et du temps de culture : 25°C et 30° C sont les températures optima de croissance ainsi observées.

La confrontation de nos résultats avec ceux de SCHUBERT nous révèle quelques différences dont certaines méritent d'être approfondies. Si nous considérons les tests R.M. et V.P. : SCHUBERT donne comme variable le test R.M. pour la plupart des espèces; l'utilisation du milieu de FOUAD, effectivement, nous révèle dans un certain nombre de cas des tests R.M. et V.P. positifs, mais l'addition d'extrait de Levures (1 0/00) au milieu de FOUAD nous permet d'obtenir une dissociation des deux tests en R.M. négatif et V.P. positif, et R.M. positif et V.P. négatif, ce qui facilite grandement l'identification des espèces.

L'étude des fermentations sucrées ne répond pas rigoureusement aux critères d'identification donnés par SCHUBERT : il faut toutefois signaler que nos résultats sont toujours concordants en ce qui concerne la non utilisation de certains sucres ou alcools, xylose, dulcitol, inositol, adonitol.

Le fait que toutes nos souches d'Aeromonas fermentent le lactose nous suggère qu'il peut y avoir une relation entre ces Aeromonas et le milieu.

Il ressort de nos identifications qu' Aeromonas punctata ssp. caviae est le plus fréquemment isolé, suivi de Aeromonas hydrophila, Aeromonas punctata, Aeromonas hydrophila ssp. anaerogenes, Aeromonas hydrophila ssp. proteolytica et Aeromonas salmonicida ne sont pas isolés de nos échantillons de lait; nous ne devons pas en déduire que ces espèces ne se trouvent pas dans le lait pasteurisé : en effet, la façon, officielle, dont nous conduisons le contrôle de nos échantillons ne nous permet pas de révéler leur présence : la mise au point d'un milieu sélectif qui exalte la croissance des Aeromonas en inhibant celle des Entérobactéries permettra peut-être de résoudre ce problème que nous sommes en train d'étudier.

Tableau XIV

Identification des souches d'*Aeromonas* isolées des laits pasteurisés conditionnés

ESPECES		A. hydrophila		A. hydrophila ssp. anaerogenes		A. hydrophila ssp. proteolytica		A. punctata		A. punctata ssp. caviae		A. salmonicida	
CARACTERES		S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O
Mobilité													
Mobilité													
Culture sur B.N.													
Hémolyse (sang de mouton)													
H ₂ S (Kligler)													
H ₂ S (E.P.)													
Indole													
Amylase													
Gélatinase													
Lécithinase													
Caséinase													
Nitrate → Nitrite													
Uréase													
R.M.													
V.P.													
Butanédiol-déshydrogénase													
Fermentations :													
Adonitol													
Amidon													
Arabinose													
Cellobiose													
Dulcitol													
Fructose													
Galactose													
Glucose													
Glycérol													
Glycogène													
Lactose													
Maltose													
Mannitol													
Mannose													
Raffinose													
Rhamnose													
Saccharose													
Salicine													
Sorbitol													
Tréhalose													
Xylose													
Malonate													
Source de C. :													
l - arginine													
l - asparagine													
l - histidine													
Croissance : 37° C - 24 h													
41° C - 7 j.													
44° C - 7 j.													
15° C - 24 h													
10° C - 48 h													
5° C - 10 j.													
Substrat à 7,5 %NaCl													
Nombre de souches		136		20		0		92		343		0	
Nombre d'échantillons de lait pasteurisé conditionné contaminés par les différentes espèces d' <i>Aeromonas</i>		58		7		0		30		162		0	

T = trouble et fine pellicule

T' = trouble ou non, avec sédiment

+ = culture ou réaction positive

- = pas de culture ou réaction négative

v = culture ou réaction variable

Fermentations : ++ = acidification avec production de gaz

+ = acidification sans production de gaz

+v = acidification et production de gaz variable

IV - ETUDE STATISTIQUE DE LA
FLORE INDOLOGENE AERO-
ANAEROBIE ISOLEE DES
LAITS PASTEURISES CONDI-
TIONNES

A la suite des identifications, nous sommes amenée à étudier le problème de la contamination par Aeromonas et par les Entérobactéries indologènes du point de vue statistique.

1. METHODE

Dans cette étude, les fréquences, en pourcentage, sont évaluées en calculant les limites de confiance des proportions avec une sécurité de 95 %, d'après les formules ci-après :

$$\text{Limite inférieure} = a - k\sqrt{a} + C_i$$

$$\text{Limite supérieure} = a + k\sqrt{a} + C_s$$

a représente l'effectif possédant un caractère donné dans un ensemble de n échantillons ;

k est un coefficient qui varie avec le pourcentage observé ;

C_i et C_s sont des termes de correction qui dépendent du pourcentage, $p = \frac{a}{n} \times 100$, trouvé dans l'ensemble.

K , C_i et C_s sont calculés d'après des tables (204).

Par ailleurs, la méthode du X^2 corrigé nous permet de comparer le pourcentage de contamination par Aeromonas au pourcentage de contamination par les Entérobactéries indologènes.

2. FREQUENCE DE LA CONTAMINATION PAR AEROMONAS

163 échantillons sur 507 sont contaminés par Aeromonas seul, en tant qu'indologène, soit 32,1 % des laits contrôlés. Le calcul des limites de confiance pour une telle proportion, avec une sécurité de 95 %, nous permet de situer ce pourcentage entre 28,1 et 36,5.

163 échantillons sur 288 contaminés par des bactéries indologènes le sont par Aeromonas seul, c'est-à-dire 56,5 % proportion située entre 49,9 et 63,3 : ainsi la moitié environ de ces échantillons contiennent uniquement des Aeromonas comme bactéries indologènes.

3. COMPARAISON ENTRE LA CONTAMINATION PAR LES ENTERO-BACTERIES INDOLOGENES ET LA CONTAMINATION PAR AEROMONAS

Si nous considérons que les Entérobactéries indologènes des laits contrôlés constituent un ensemble dans lequel nous avons deux distributions, l'une avec Aeromonas, l'autre sans Aeromonas, nous constatons tout d'abord que le pourcentage des Entérobactéries indologènes associés à Aeromonas est de $\frac{56}{219} \times 100 \approx 25,57$ celui sans Aeromonas de $\frac{69}{288} \times 100 \approx 23,96$.

Nous nous posons alors la question de savoir si la différence entre ces deux pourcentages est significative, c'est-à-dire si la présence des Entérobactéries indologènes est liée ou non à la présence d'Aeromonas. Si nous admettons l'hypothèse selon laquelle la présence des Entérobactéries indologènes est indépendante de la présence ou de l'absence d'Aeromonas, cela signifie que le pourcentage des cas où nous décelons des Entérobactéries indologènes est indépendant des Aeromonas. Nous testons cette hypothèse par la méthode du X^2 corrigé, à partir du tableau de contingence ci-après.

		Aeromonas		Total
		+	-	
Entérobactéries indologènes	+	56 a	69 b	125 a + b
	-	163 c	219 d	382 c + d
Total		219 a + c	288 b + d	507 N

+ = Présence

- = Absence

La valeur du X^2 corrigé est calculée à partir de la formule suivante :

$$X_c^2 = \frac{N \cdot \left[|ad - bc| - \frac{N}{2} \right]^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \quad \text{avec } N = a+b+c+d$$

$$X_c^2 = 0,098$$

Les tables de X_c^2 pour un degré de liberté montrent que si les deux distributions avec *Aeromonas* et sans *Aeromonas* sont tirées d'un même ensemble (c'est-à-dire si les présences d'Entérobactéries indologènes et d'Aeromonas ne sont pas liées), il y a 95 % de chance sur 100 pour que les deux échantillons diffèrent de telle façon que le X_c^2 est inférieur à 3,84. Si le X_c^2 était supérieur à 3,84, nous en concluons que la probabilité de trouver deux échantillons aussi différents est inférieure à 5 %, donc l'hypothèse n'est pas valable.

4. Comparaison entre la contamination par *E. coli* et
la contamination par *Klebsiella* indologène

Pour comparer la contamination par *E. coli* et par *Klebsiella* indologène, à partir des résultats obtenus, nous dressons le tableau de contingence suivant :

		E. coli		
		+	-	Total
Klebsiella	+	18 a	56 b	74 a+b
	-	46 c	387 d	433 c+d
Total		64 a+c	443 b+d	507 N

+ = présence

- = absence

Le χ^2 évalué à partir de ce tableau est de 13,36. Nettement supérieur à 3,84 (seuil pour une sécurité de 95 %), il montre que les contaminations par *E. coli* et par *Klebsiella* indologène sont liées : nous sommes alors tentée de considérer que *Klebsiella* indologène peut témoigner d'une contamination d'origine fécale. Le calcul viendrait-il confirmer une hypothèse émise par certains bactériologistes de l'origine fécale de *Klebsiella* ? Il est prématuré d'affirmer une telle éventualité, mais les résultats de nos contrôles semblent être un argument en faveur d'une telle hypothèse.

V - INTERPRETATION DE LA PRESENCE
D'AEROMONAS DANS LES LAITS
PASTEURISES CONDITIONNES

Pour nous permettre d'interpréter la présence d'Aeromonas dans les laits pasteurisés conditionnés il nous paraît indispensable de faire une revue bibliographique concernant ce type de bactérie encore peu connu.

L'intérêt des Aeromonas nous semble présenter à l'heure actuelle, trois aspects :

- 1°) en pathologie des Poikilothermes
- 2°) en pathologie des Homéothermes
- 3°) en bactériologie alimentaire.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Aeromonas et pathologie des Poikilothermes

SANARELLI, en 1891, découvre que Bacillus hydrophilus fuscus (22) dont l'habitat est l'eau, est pathogène pour la grenouille. Depuis une quarantaine d'années, différents chercheurs rapportent des cas d'infection chez les Poissons provoquée par des bactéries aujourd'hui reconnues comme appartenant au genre Aeromonas : c'est ainsi que SCHAPERCLAUS, (282) en 1965, effectuant

une mise au point de ses recherches entreprises dès 1939 sur l'hydropisie infectieuse de la carpe reconnaît comme germe responsable Aeromonas punctata. En 1942, KULP et BORDEN (185) démontrent que Proteus hydrophilus est responsable, chez la grenouille, du "Red-leg", sorte de septicémie qui se traduit par un oedème important de l'abdomen et des cuisses ; à peu près au même moment GUTHRIE et HITCHNER (137) isolent Proteus hydrophilus du brochet, de la truite et de la grenouille. GRIFFIN et coll. (129) en 1952 décrivent Bacterium salmonicida pathogène pour les Salmonidés, bactérie immobile qui donne une culture pigmentée brun rougeâtre sur milieu gélosé nutritif : en 1953 ils la dénomment Aeromonas salmonicida, (130).

ROSS (274) en 1962, isole une souche d'Aeromonas pigmentée, brun rougeâtre, dont le pigment hydrosoluble diffuse largement sur milieu gélosé contenant de la tyrosine. OJALA (243) en 1966 isole des truites atteintes de septicémie une bactérie qui peut être considérée comme étant Aeromonas salmonicida mais qui ne diffère pas énormément d'Aeromonas formicans. Le même auteur (244) en 1968, effectuant une étude sur la fréquence d'Aeromonas hydrophila et Aeromonas punctata chez des poissons sains et soupçonnés d'infection considère que la fréquence d'Aeromonas hydrophila et d'Aeromonas punctata s'établit, selon les organes considérés, de la façon suivante : intestin 8 %, branchies 23 %, narines 40 % ; OJALA considère que ces Aeromonas peuvent être pathogènes lorsque les poissons se trouvent en état de moindre résistance en raison de conditions défavorables du milieu. En U. R. S. S., en 1968, LOBOUNT-ZOV et ROUDIKOV (207) isolent des souches très virulentes d'Aeromonas punctata de carpes atteintes d'hydropisie infectieuse et montrent qu'une injection intraveineuse de filtrat amicrobien provenant de la culture de ces souches entraîne la mort de souris blanches en 20 à 72 heures ; ils pensent qu'il s'agit là d'une intoxication provoquée par une exotoxine élaborée par Aeromonas punctata. La même année en Bulgarie, JANKOV (163) (164), étudiant le rôle pathogène d'Aeromonas

et de Pseudomonas dans l'hydropisie infectieuse de la carpe considère que c'est essentiellement Aeromonas punctata qui est responsable de l'éclosion de la maladie. Au même moment, en Grande-Bretagne, SCOTT (303) envisage la transmission possible de la maladie de poisson malade à poisson sain par Aeromonas salmonicida, aussi bien en eau salée qu'en eau douce ou qu'en eau saumâtre. Toujours en Grande-Bretagne, en 1969, MANDESLEY et THOMAS (221) signalent plusieurs épidémies, chez les Salmonidés, qui se manifestent par des lésions cutanées dont l'agent pathogène se révèle être Aeromonas salmonicida. De son côté, SHIMIZU, (307) (308) (309) (310) au Japon, publie une série de travaux concernant le caractère pathogène d'Aeromonas liquefaciens : il isole, à partir du filtrat acellulaire de culture des facteurs toxiques à propriétés antigéniques et nécrotiques pour l'anguille et le cobaye. Aux U. S. A., PIPPY et HARE (257) en 1969 signalent qu'il existe une relation entre l'augmentation de la pollution des rivières et l'infection provoquée chez les poissons par Aeromonas liquefaciens. En 1971, VEZINA et coll. (352) isolent Aeromonas hydrophila de la perche. DIVE, DUEE et LECLERC (80) publient, la même année, une étude bactériologique concernant une épizootie survenue chez des poissons d'eau douce dans le Nord de la France et révèlent que, dans 72 % des cas examinés, Aeromonas représente la flore bactérienne dominante. En 1972, SHOTTS et coll. (311) signalent qu' Aeromonas hydrophila et Aeromonas shigelloides sont liés à la mort de poissons et de reptiles du lac Apapka qui présente des conditions favorables à l'infection de ces animaux par ces Aeromonas. En Bulgarie, il y a peu de temps, BONEV et ZAKHARIEV (19) mettent en évidence Aeromonas dans les moules de la mer Noire.

Les Aeromonas sont donc des bactéries qui, à l'heure actuelle posent un problème en ichthyopathologie.

1.2. Aeromonas et pathologie des Homéothermes, plus particulièrement de l'Homme

C'est en 1954 que Hill et coll., (151) rapportent dans la revue médicale des Antilles un cas de myosite aiguë chez un homme de 40 ans, localisée aux bras et aux jambes, dont le germe responsable, fermentant, producteur d'acétylméthylcarbinol, indologène, monotriche, appartient à la famille des Pseudomonadaceae : cet homme meurt en 48 heures ; le germe en cause est bien un Aeromonas. En 1955, KJEMS (177), au Danemark, isole Aeromonas à partir d'une hémoculture effectuée sur le sang d'une malade atteinte de septicémie. En 1958, CASELITZ et BUCK (44) étudient un Aeromonas isolé d'un patient atteint d'ostéomyélite. En 1961, MARTINEZ - SILVA et coll. (218), à Bogota, signalent 9 cas d'entérite aiguë observée chez des nouveaux-nés dans une maternité : dans 6 cas, l'étude bactériologique des matières fécales met en évidence des Aeromonas associés à d'autres bactéries ; dans le seul cas où le nouveau-né est décédé, la coproculture révèle une culture pure d'Aeromonas. La même année, au Danemark, LAUTROP (188) relate qu'après examen de 4 500 matières fécales pour rechercher les germes pathogènes responsables de troubles intestinaux et détecter la présence éventuelle d'Aeromonas hydrophila, six échantillons contiennent Aeromonas hydrophila ; chez huit malades présentant des troubles intestinaux mais par ailleurs atteints de péritonite tuberculeuse, lithiase biliaire, herpès, carcinome du rectum, phlébite, intoxication par des barbituriques, tuberculose pulmonaire, fibrillation auriculaire, l'examen bactériologique des matières fécales révèle la présence d'Aeromonas hydrophila : sans traitement spécial, ces troubles intestinaux peu graves (diarrhée - douleurs abdominales - peu de fièvre) ont disparu en deux à cinq jours, exception faite pour le malade atteint de carcinome pour qui ces troubles ont duré pendant six semaines : après deux mois, on ne retrouve plus Aeromonas hydrophila dans les feces. En 1962, CASELITZ et KREBS (46) étudient le rôle pathogène des Aeromonas chez les animaux et plus particulièrement chez le lapin : ils concluent que la virulence varie d'une souche à l'autre, que les

filtrats amicrobiens peuvent être pathogènes, qu'il paraît y avoir une corrélation entre le caractère hémolytique et le pouvoir pathogène, sans que la toxine mortelle soit identique à l'hémolysine. En 1964, ROSNER (273) isole Aeromonas hydrophila des matières fécales d'une fillette de 10 ans atteinte de gastro-entérite. En 1965, CATSARAS et BUTTIAUX (49), après examen de 4 426 matières fécales, provenant d'enfants âgés de moins de deux ans, n'isolent Aeromonas hydrophila que dans 6,77 % des cas : ils ne décèlent ni Aeromonas salmonicida, ni Aeromonas shigelloides ; ces auteurs pensent que l'on ne peut pas affirmer que l'Aeromonas présent dans les matières fécales est à l'origine des troubles intestinaux observés. La même année, en Afrique, l'étude de 100 cas de diarrhée observée chez des enfants, âgés de trois mois à deux ans et demi, montre que dans 8 % des cas Aeromonas formicans est isolé (230) (231).

En 1966, GEIZER et coll. (112) isolent Aeromonas shigelloides des matières fécales d'un enfant. BULGER et coll. (27) isolent chez deux malades Aeromonas hydrophila : dans un cas, la septicémie provoquée par Aeromonas entraîne la mort. En 1967, (115) et en 1970 (116) GILARDI met en évidence Aeromonas punctata à partir de coprocultures, de prélèvements pharyngés et d'expectorations, et prouve ainsi que l'homme peut être porteur d'Aeromonas. De son côté, SCHUBERT (293) signale que de temps en temps on rencontre, chez l'animal et chez l'homme, des infections dues à Aeromonas hydrophila. Des infections provoquées expérimentalement chez la souris montrent que Aeromonas punctata. Aeromonas punctata ssp. caviae et Aeromonas hydrophila ssp. anaerogenes n'entraînent pas la mort de l'animal, si ce n'est à partir de concentrations en bactéries extrêmement élevées, alors que Aeromonas hydrophila est virulent à faible concentration. Pour cette raison, SCHUBERT considère que Aeromonas punctata et les sous-espèces anaerogenes, Aeromonas punctata ssp. caviae et Aeromonas hydrophila ssp. anaerogenes sont apathogènes.

En 1969, NAUMANN et coll. (237) isolent Aeromonas hydrophila du pus retiré de l'espace rétro-péritonéal droit lors d'une laparotomie effectuée sur un malade atteint de cancer. En 1968 et 1970, STILLE et coll. (329) et HELM et STILLE (245) rapportent des cas d'entérite aiguë due à Aeromonas hydrophila. En 1970, GRAEVENITZ et coll. (124) étudiant les matières fécales provenant de 173 adultes et 15 enfants ne présentant aucun signe clinique, et sans que l'eau ingérée par ces patients ne contienne Aeromonas, trouvent que 3,2 % des individus sont porteurs d'Aeromonas hydrophila, mais n'isolent jamais Aeromonas punctata : ils mettent au point un milieu de culture pour détecter Aeromonas hydrophila dans les matières fécales. La même année, NYGAARD et coll. (241) étudiant 48 souches d'Aeromonas d'origine humaine et animale montrent que ce sont des Aeromonas hydrophila capables pour la plupart de se développer à 42° C. En 1971, HIBBS et coll. (150) inoculent Aeromonas hydrophila au lapin et provoquent ainsi expérimentalement un syndrome clinique analogue à une colite hémorragique, mais signalent le rôle que jouent les conditions dans lesquelles se trouve l'animal sur la virulence d'Aeromonas hydrophila.

ABRAMS et coll. (2) relatent chez un malade atteint de leucémie l'éclosion d'une septicémie provoquée par Aeromonas hydrophila. En 1972, CHATTERJEE et NEOGY (52), en Inde, isolent Aeromonas associé à Vibrio des matières fécales provenant de sujets atteints de choléra, et pensent que ces bactéries ont la même origine, à savoir l'eau. PEARSON et coll. (254) décrivent trois cas de septicémie provoquée par Aeromonas hydrophila isolé par hémoculture chez des enfants de quatre à six ans atteints de leucémie lymphocytaire : le traitement par les antibiotiques a éliminé Aeromonas hydrophila mais la porte d'entrée du germe reste inconnue. Il y a quelques mois, WASHINGTON (355) détecte Aeromonas hydrophila lors de contrôles bactériologiques cliniques tandis que ZAJC - SATLER (362)

étudie 27 souches d'Aeromonas provenant de laboratoires de contrôles médicaux et LUDVA (210) signale une contamination de produits thérapeutiques par Aeromonas.

1.3. Aeromonas et bactériologie alimentaire

Il est vraisemblable que c'est ZIMMERMANN en 1890 (363) qui le premier met en évidence dans l'eau du robinet, Bacillus punctatus, reconnu aujourd'hui comme étant Aeromonas punctata, et qui ainsi pose le problème de la présence d'Aeromonas dans les eaux d'alimentation. C'est depuis 1962, grâce aux travaux de LECLERC et BUTTIAUX (189) (193) que l'on peut considérer Aeromonas comme une bactérie faisant partie de la flore normale non seulement des eaux en général (148) (266) (292) (300) mais des eaux de distribution en particulier, que ces eaux soient traitées ou non.

En ce qui concerne les denrées alimentaires proprement dites, KIELWEIN et coll. (175) rapportent qu'en 1936 AITKEN isole Aeromonas d'un pâté à base de viande et qu'en 1959, EDDY et KITCHELL signalent la présence d'Aeromonas hydrophila dans la viande congelée. Par ailleurs, Proteus melanovogenes, responsable de l'altération des oeufs de poule, observée en 1937 par MILES et HALNAN n'est autre qu'Aeromonas (227). En 1959, BUTTIAUX (33) pense qu'Aeromonas joue un rôle dans la fabrication du saucisson cru. En 1967, nous isolons pour la première fois Aeromonas du lait pasteurisé conditionné (350) et en 1968 du lait cru réfrigéré (non publié), en étudiant la flore psychrotrophe. De leur côté, en 1969, KIELWEIN et KIELWEIN et coll. (172) (173) (174) (176) signalent la présence d'Aeromonas dans 17 % des laits crus contrôlés et étudient quelques-unes des propriétés d'Aeromonas, en même temps que celles de Pseudomonas, ayant une incidence sur la qualité des produits laitiers.

2. DISCUSSION

Cette revue bibliographique nous montre que les Aeromonas sont connus depuis longtemps en ichthopathologie, qu'ils sont isolés chez l'homme, malade ou sain, depuis moins de vingt ans et que le problème posé par les Aeromonas en bactériologie alimentaire proprement dite est récent.

Les travaux concernant Aeromonas en pathologie des Poikilothermes font ressortir que cette bactérie est particulièrement virulente dans des conditions anormales d'environnement pour l'animal.(80) (257) (311).

Pour l'homme, il est exceptionnel qu'Aeromonas soit seul responsable de la maladie : en effet, dans la plupart des cas connus, ou Aeromonas est associé à d'autres bactéries, ou il est isolé de sujets présentant des syndromes qui ne sont en rien en relation avec la présence d'Aeromonas : nous voyons donc qu'intervient ici, comme pour les Poikilothermes, la notion de conditions dans lesquelles se trouvent l'individu porteur d'Aeromonas : l'éclosion de l'infection provoquée par Aeromonas a lieu en général chez des sujets se trouvant en état de moindre résistance.

D'autre part, les études faites par LAUTROP (188) et CATSARAS et BUTTIAUX (49) sur un grand nombre de matières fécales montrent que la fréquence de la présence d'Aeromonas y est faible. Si l'homme héberge Aeromonas au niveau de son tractus intestinal, ce n'est qu'à titre transitoire, et il semble bien que ce n'est qu'à la faveur de conditions particulières qu'il peut y proliférer. D'après les cas rapportés, il ressort que c'est essentiellement Aeromonas hydrophila qui pourra être considérée comme pathogène pour l'homme (242) : l'infection expérimentale provoquée chez la souris par inoculation des différentes espèces d'Aeromonas (293) est un argument en faveur d'une telle assertion.

Il semble donc que nous ne pouvons interpréter la présence d'Aeromonas dans le lait pasteurisé conditionné comme le témoignage d'une contamination dangereuse ou d'une contamination d'origine fécale, donc suspecte.

VI. ACTION SUR LE LAIT DES AEROMONAS
ISOLES ET ETUDE DU SYSTEME
ENZYMATIQUE COAGULANT ET
PROTEOLYTIQUE CHEZ UNE DES
SOUCHES, AEROMONAS HYDROPHILA
ELP 5

Les caractères caséolytique et psychrotrophe mis en évidence lors de l'identification des souches nous suggèrent qu'Aeromonas peut intervenir dans l'altération du lait, même stocké aux températures de réfrigération.

Nous étudions donc le comportement de nos souches sur milieux au lait et à la caséine, à différentes températures, en fonction du temps, à la suite de quoi nous essayons d'isoler et d'étudier le système enzymatique coagulant et protéolytique de l'une de nos souches.

1. Action sur le lait des souches isolées

1.1. Conditions de culture

- en aéro-anaérobiose : 50 ml de lait (A_6) en ballons de 100 ml sont inoculés avec 0,20 ml d'une suspension bactérienne en eau physiologique provenant d'une culture de 18 heures sur milieu gélosé nutritif.

Le tableau XV donne les températures et temps d'incubation.

- en aérobiose : à partir d'une culture de 18 heures sur milieu gélosé nutritif, ensemencement en piqure de milieux gélosés au lait (A_7) et au caséinate (A_8) coulés en boîte de Pétri.

Pour tous ces essais des milieux témoins sont placés dans les mêmes conditions.

1.2. Résultats

Le tableau XV permet trois observations importantes :

- Le pouvoir coagulant et protéolytique diminue avec l'abaissement de la température pour n'être plus apparent macroscopiquement à 5° C, à l'exception de quelques souches d'A. punctata et d'un nombre plus important de souches d'A. hydrophila. A l'abaissement de la température correspond un allongement du temps requis pour observer la coagulation.

L'activité coagulante et protéolytique est variable selon les espèces et selon les souches dans une même espèce : nous constatons qu'A. hydrophila a un pouvoir coagulant et protéolytique plus accentué qu'A. punctata qui se traduit par une coagulation et une hydrolyse de la caséine plus rapide à toute température.

A première vue, et dans nos conditions d'expérience, les Aeromonas étudiés ont moins d'action sur le lait aux basses températures.

Dans cette série d'essais, nous notons la valeur du pH des cultures de 24 heures à 21 jours, selon la température d'incubation; la valeur minima du pH observée sur les cultures d'Aeromonas hydrophila est de 5,75 et sur celles d'Aeromonas punctata de 5,35 après 48 heures d'incubation.

La coagulation observée par culture sur lait n'est pas une coagulation provoquée par l'acidification du milieu, mais plutôt une coagulation d'origine enzymatique.

Le tableau XVI montre qu'à toute température, nos Aeromonas dégradent dans l'ensemble plus rapidement le caséinate que le lait.

Tableau XV

Action sur le lait des souches d'*Aeromonas* isolées (en semi anaérobiose)

	Effectif	30		162		58		7	
θ	Espèces Temps	<i>A. punctata</i>		<i>A. punctata</i> sép. <i>caviae</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i> ssp. <i>anaerogenes</i>	
		C	P	C	P	C	P	C	P
30°C	24 heures	30	-	47	-	35	35	3	3
	5 jours		30	82	53	23	23	4	4
	7 jours			33	109				
		30	30	162	162	58	58	7	7
15°C	24 heures	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 jours	18	4	105	-	46	31	3	2
	7 jours	-	14	7	112	4	19	1	1
	14 jours	4	4	17	16	4	4	1	1
	21 jours	4	4	9	10	4	4		
		26	26	138	138	58	58	5	4
10°C	5 jours	-	-	40	-	14	-	-	-
	10 jours	7	7	52	63	35	49	3	1
	21 jours	10	10	11	40	9	9	1	2
		17	17	103	103	58	58	4	3
5°C	21 jours	-	-	-	16	-	17	-	1

C = coagulation

P = peptonisation décelable macroscopiquement

θ = température

Tableau XVI

Action sur le lait et le caséinate des souches d'*Aeromonas* isolées (en aérobiose)

	Effectif	30		162		58		7	
θ	Espèces Temps	<i>A. punctata</i>		<i>A. punctata</i> <i>ssp. caviae</i>		<i>A. hydrophila</i>		<i>A. hydrophila</i> <i>ssp. anaerogenes</i>	
		C	L	C	L	C	L	C	L
30°C	24 heures	22	-	86	37	50	32	4	2
	48-72 heures	1	17	11	12	5	8	2	-
	96 heures	7	4	23	69	-	14	-	-
	7 jours	-	9	42	44	3	4	1	5
		30	30	162	162	58	58	7	7
15°C	24 heures	-	-	10	-	27	18	3	1
	48-72 heures	26	4	65	81	19	26	2	-
	96 heures	1	-	-	-	-	-	-	-
	7 jours	3	26	87	65	12	14	2	6
		30	30	162	146	58	58	7	7
10°C	24 heures	-	-	-	-	-	-	-	-
	48-72 heures	-	3	-	-	16	13	-	-
	96 heures	19	-	38	41	29	30	3	1
	7 jours	17	21	16	19	18	17	1	2
		26	24	54	60	53	50	4	3
5°C	24 heures	-	-	-	-	-	-	-	-
	48-72 heures	-	-	-	-	-	-	-	-
	96 heures	-	-	5	-	20	7	-	-
	7 jours	11	8	19	10	16	27	3	0
		11	8	24	10	36	34	3	0

C = culture sur milieu gélosé au caséinate

L = culture sur milieu gélosé au lait

θ = température

Le pouvoir caséolytique s'avère plus intense chez Aeromonas hydrophila que chez Aeromonas punctata.

Nous observons la même variation du pouvoir protéolytique selon les souches d'une même espèce que dans le cas des cultures observées en semi-anaérobiose.

Ces résultats nous amènent à l'étude plus approfondie du système enzymatique coagulant et protéolytique chez une de nos souches, Aeromonas hydrophila ELP 5 choisie parmi celles qui ont donné des résultats positifs à 30°C, 15°C, 10°C, et 5°C.

2. Le système enzymatique coagulant et protéolytique chez Aeromonas hydrophila ELP 5

2.1. Méthodes

2.1.1. Conditions de culture :

A partir d'une suspension bactérienne en eau physiologique provenant d'une culture de 18 heures sur milieu gélosé nutritif incliné, inoculation de six fioles Erlenmeyer de 500 ml contenant 250 ml de milieu, à raison de 1 ml de suspension par fiole : l'ensemencement représente de 2,5 à 3. 10^7 bactéries.

Ces cultures sont maintenues à 30°C pendant 72 heures, sans agitation, dans un bain-marie thermostaté.

2.1.2. Obtention de la solution enzymatique :

Dans une centrifugeuse réfrigérée (Heraeus type Zeta 17) les cultures sont soumises à 14.500 g à 5°C pendant 30 minutes.

Le surnageant subit ensuite dans des conditions rigoureuses d'asepsie, une filtration stérilisante sous vide à travers un filtre Seitz.

Ce filtrat acellulaire est traité au sulfate d'ammonium jusqu'à 50 % de saturation, maintenu à 5°C pendant une heure et centrifugé à 30.000 g à 5°C pendant 30 minutes et recueilli.

Le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium jusqu'à 75 % de saturation, le mélange maintenu à 5°C pendant une nuit et centrifugé à 30.000 g pendant 30 minutes à 5 °C.

Les deux culots de centrifugation sont alors dissous dans du tampon véronal 0,05 M pH 8 et la solution ainsi obtenue dialysée contre le même tampon à 5°C pendant une nuit.

Sur la solution enzymatique ainsi obtenue nous testons l'activité coagulante et protéolytique.

2.1.3. Mesure de l'activité coagulante

Nous utilisons comme substrat, du lait écrémé reconstitué par dissolution de 12 g de "Skim-Milk Difco" dans 100 ml d'eau distillée stérile. Son pH est de 6,5.

Au moment d'effectuer le test, 5 ml de lait sont introduits dans un tube à essais de 160 x 16 mm stérile; 0,25 ml d'une solution de CaCl_2 0,2 M est ajouté pour obtenir un lait dont la concentration en CaCl_2 est de l'ordre de 0,01 M; 0,5 ml du filtrat acellulaire ou de la solution enzymatique est ensuite introduit et mélangé au substrat. Placé à 30°C dans un bain-marie thermostaté, nous notons le temps mis pour obtenir le début de coagulation; ce temps exprimé en minutes constitue la mesure de l'activité coagulante. Nous considérons comme unité enzyme (U.E.) la quantité d'enzyme contenue dans 0,5 ml de solution

permettant la coagulation de 5 ml de lait (préparé dans les conditions décrites ci-dessus) à 30°C en 3 minutes.

2.1.4. Mesure de l'activité protéolytique

La technique de FOLIN modifiée permet d'évaluer la concentration en tyrosine provenant de la dégradation de la caséine.

Nous utilisons comme substrat la caséine Hammersten (MERCK) à 1 % dans un tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,45.

5 ml de substrat additionnés de 0,5 ml d'une solution de CaCl_2 $6 \cdot 10^{-2}$ sont soumis à l'action de 1 ml de solution enzymatique pendant 10 minutes à 45°C. La réaction est ensuite stoppée par addition de 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique (T.C.A.) à 10 %, et au bout de 10 minutes une filtration sur papier Whatman n° 3 est effectuée.

2 ml de filtrat sont neutralisés par addition de 5 ml d'une solution de carbonate de sodium à 20 %, et 1 ml de réactif de FOLIN dilué 3 fois ajouté. La coloration du mélange apparaît et nous la laissons se développer à température ambiante pendant 20 minutes.

La densité optique (D.O.) est alors mesurée à 660 nm au spectrophotomètre Beckmann Acta II qui permet d'évaluer l'activité protéolytique par référence à la courbe étalon représentant la D.O. à 660 nm en fonction de la concentration en tyrosine évaluée en mg/ml (fig. 1).

2.2. Le système enzymatique coagulant et protéolytique

2.2.1. Conditions de production

Nous déterminons les conditions optima de production de ce système enzymatique en choisissant de cultiver la souche sur le milieu de culture le plus favorable, à la température optima de croissance, pendant un temps requis pour obtenir une activité maxima.

à 660 nm.

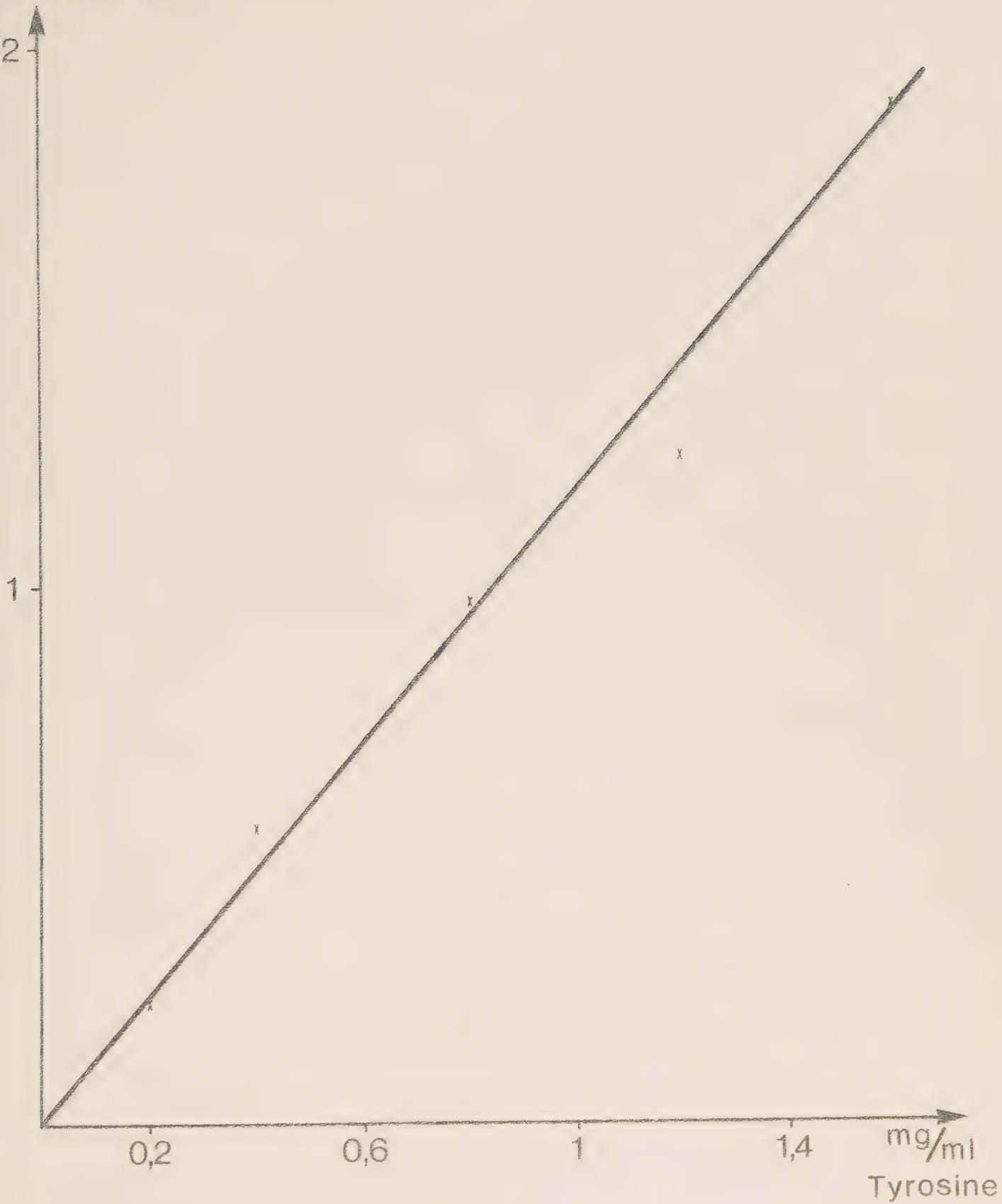


Fig. 1

2.2.1.1. Le milieu de culture

La mise en culture de notre souche sur différents milieux dans lequel l'apport en azote est constitué par des peptones d'origine différente et par différents hydrolysats de caséine, nous amène à choisir la source d'azote la plus favorable à la production du système enzymatique le plus actif.

L'activité enzymatique en fonction de la source d'azote du milieu est testée sur le filtrat acellulaire par la mesure de l'activité coagulante. Nous savons en effet, d'après les résultats des études faites sur la propriété de coaguler le lait des enzymes d'origine microbienne (225) (246) (346) et d'après nos propres observations, qu'il existe une relation certaine entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique de ces enzymes. C'est donc le test de coagulation que nous utilisons pour juger de l'activité des filtrats acellulaires avant de préparer l'extrait enzymatique.

Les milieux de culture sont obtenus par dissolution dans 1 000 ml d'eau distillée de 20 g de la source d'azote.

Les résultats de l'activité enzymatique en fonction de la source d'azote constituant le milieu de culture sont consignés dans le tableau XVII : la durée limite choisie du temps de coagulation est de 60 minutes.

A la lumière des résultats obtenus, nous retenons les milieux 2 et 5, c'est-à-dire constitués de "Bactocasitone" ou de "Polypeptone".

Nous nous sommes alors demandée si l'addition de glucose à la source azotée n'améliorerait pas la production du système enzymatique recherché. Nous effectuons donc des essais de culture de notre souche sur les milieux 2 et 5 dépourvus de glucose et additionnés de

Tableau XVII

Influence de la source d'azote

Milieu de culture	pH	pH du filtrat acellulaire	Activité coagulante (en minutes)		
			30° C	45° C	65° C
. Caséinate de calcium (Merck)	7	7,15	-	45	25
. Bacto-casitone (Difco)	6,7	7,7	19	7	1
. Bacto-soytone (Difco)	6,7	7,5	-	-	-
. Trypticase (B.B.L.)	7	7,5	-	-	27
. Polypeptone (B.B.L.)	7	8,5	17	4,30	1
. Hydrolysats acide décaséine (Merck)	7	8,5	-	-	11
. Casamino-Acides (Difco)	6,7	7,5	-	-	-
. Hydrolysats pancréatique de caséine (Merck)	7	8,6	-	-	30

Bacto-casitone = mélange de peptides obtenu par dégradation pancréatique de la caséine
Bacto-soytone = peptone provenant de l'hydrolyse enzymatique de protéine de soja
Trypticase = mélange de peptides obtenu par action de la trypsine sur la caséine
Polypeptone = mélange de trypticase et de thiotone (peptone obtenu par action de la pepsine sur la viande)
Casamino-Acides = hydrolysats acide de caséine.

Tableau XVIII

Influence de la concentration en glucose

Milieu de culture			pH du filtrat acellulaire	Activité coagulante (en minutes)	
Source d'azote	Concentration en glucose g %	pH		30° C	45° C
Bacto-casitone	0	6,7	7,7	19	7
	1				
	5				
Polypeptone	0	7	8,5	17	4,30
	1				
	5				
			7,45	15	3

glucose aux concentrations de 1 et 5 0/00. Les cultures sont effectuées toujours dans les mêmes conditions et l'activité coagulante des filtrats acellulaires testée.

Le tableau XVIII rend compte des résultats obtenus.

L'observation des résultats nous montre que l'addition de glucose améliore quelque peu la production du système enzymatique.

2.2.1.2. La température d'incubation

Nous choisissons dans cette étude la température optima de croissance, déterminée lors de l'identification de nos souches, à savoir celle de 30°C.

2.2.1.3. Durée des cultures

L'influence du temps de culture est testée en cultivant la souche sur milieu à la Polypeptone et milieu au Bacto-casitone glucosés à 1 0/00 pendant 24 heures, 48 heures, 72 heures. L'activité enzymatique est déterminée sur les filtrats acellulaires par le test de coagulation dont les résultats sont consignés dans le tableau XIX.

Tableau XIX
Influence de la durée des cultures

Milieu de culture	Temps de culture (heures)	pH du filtrat	Activité coagulante (en minutes)	
			30° C	45° C
Polypeptone glucosé à 1 0/00 pH 7	24	6,82	20	6
	48	7,72	18	5
	72	8,22	15	3
Bacto-casitone glucosé à 1 0/00 pH 6,7	24	6,67	32	11
	48	6,75	20	6
	72	7,65	16	4

Les résultats fournis dans les tableaux XVII, XVIII et XIX correspondent à la moyenne d'une série de cinq essais qui ne présentent que de très faibles différences, non significatives.

Donc, nous cultivons Aeromonas hydrophila souche ELP 5 sur milieu à la polypeptone à 1 0/00 de glucose pendant 72 heures à 30°C sans agitation (cinq essais de culture à 100 R.P.M. ayant donné une activité moindre du filtrat acellulaire).

2.2.2. L'extrait enzymatique

Obtenu à partir de filtrats acellulaires de cultures d'Aeromonas hydrophila souche ELP 5, selon la technique énoncée pages 66 et 67, l'extrait enzymatique se trouve en solution dans un tampon véronal 0,05 M pH 8.

2.2.2.1. Activité coagulante

Nous rappelons que la mesure de l'activité coagulante est exprimée par le temps, en minutes, mis pour obtenir le début de coagulation dans des conditions définies.

2.2.2.1.1. Influence de la concentration en ions Ca^{++}

Sachant que l'action coagulante de la présure est activée par l'addition de calcium au lait, nous étudions l'influence de la concentration en ions Ca^{++} du lait sur l'activité coagulante de notre extrait enzymatique.

Le lait utilisé pour le test de coagulation a une concentration initiale en Ca^{++} de 1,22 mg/ml (concentration déterminée au spectrophotomètre à émission de flamme Delta Jobin Yvon, modèle Kuhlmann) : des échantillons de lait additionnés de quantité croissante de Ca^{++} sont préparés et le test de coagulation effectué.

Les résultats donnés dans le tableau XX et représentés graphiquement Fig. 2 montrent que la concentration minima en Ca^{++} nécessaire pour obtenir la coagulation est de 1,54 mg/ml et que l'addition de Ca^{++} diminue le temps de coagulation.

2.2.2.1.2. Influence de la température et stabilité thermique

Le test de coagulation est réalisé à différentes températures et le temps au bout duquel le début de coagulation est observé est noté.

Tableau XX
Influence de la concentration en Ca^{++} sur l'activité coagulante

Concentration en ions Ca^{++} du lait (mg/ml)	Temps de coagulation (en minutes et secondes) à 30°C
1,255	Pas de coagulation le lait est digéré en 30 minutes
1,35	
1,45	
1,54	3 mn
1,64	1 mn
1,735	45 sec. à 1 mn
1,83	45 sec.
1,925	30 sec.

Le tableau XXI et la représentation graphique des résultats Fig. 3 nous montrent qu'à une élévation de la température correspond une augmentation de l'activité coagulante.

mps de coagulation

mn.

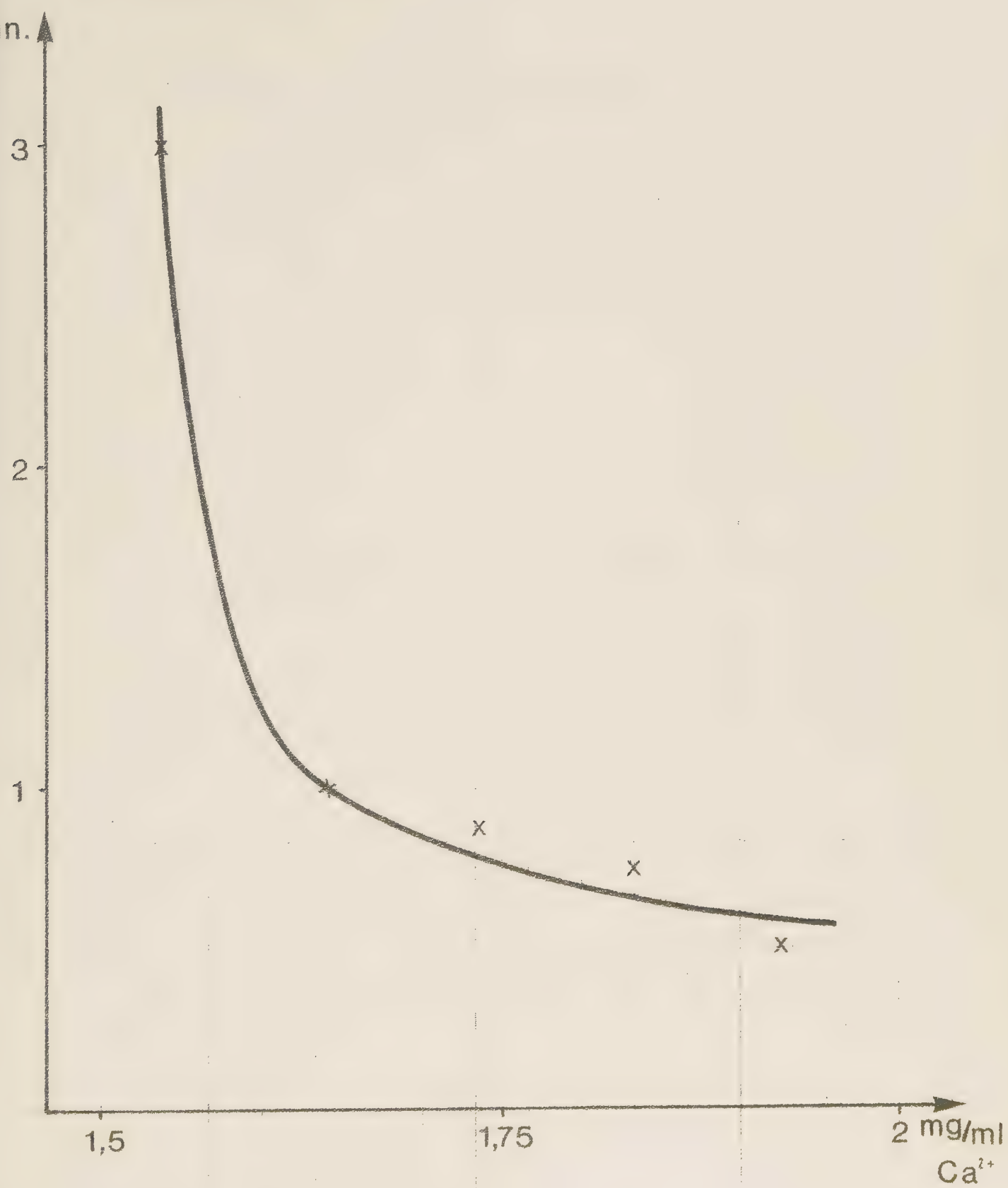


Fig. 2

Tableau XXI

Influence de la température sur l'activité coagulante

Température (en ° C)	Temps de coagulation (en minutes et secondes)
30	3 mn
35	1 mn 30 sec.
45	30 sec.
55	15 sec.
65	8 sec.
75	3 sec.

Pour étudier la stabilité thermique de l'activité coagulante nous effectuons deux séries d'essais.

Dans la première série la température reste constante tandis que varie le temps de chauffage, L'extrait enzymatique est soumis aux températures de 60°C et 75°C pendant 5, 10, 20, 30 minutes et 1 heure et le test de coagulation effectué.

Les résultats consignés dans le tableau XXII et leur représentation graphique Fig. 4 font ressortir qu'un chauffage à 60° C pendant 1 heure n'inhibe pas l'activité coagulante; par contre, l'activité coagulante diminue de façon appréciable avec l'augmentation de la durée du chauffage à 75°C pour être nulle après 60 minutes de chauffage à 75°C.

temps de coagulation

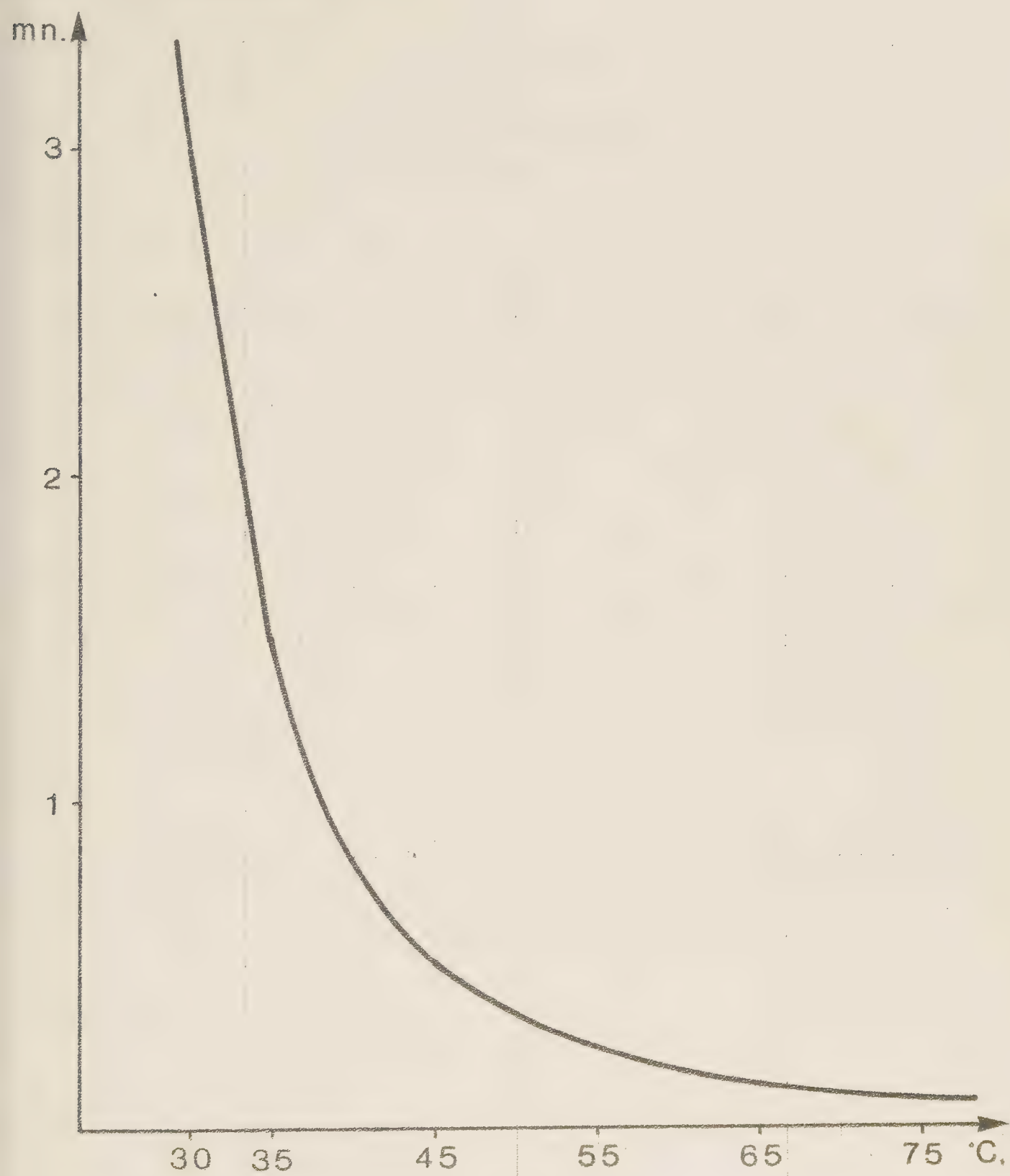


Fig.3

Tableau XXII

Influence du temps de chauffage à 60°C
et à 75°C sur l'activité coagulante

Durée du chauffage (en minutes)	Chauffage à 60°C	Chauffage à 75°C
	Activité coagulante (en minutes et secondes)	Activité coagulante à 30°C (en minutes et secondes)
5	1 à 1,30	3
10	1,30	7
20	1,30	15
30	1,30 à 2	27
60	2	supérieur à 60

Dans une deuxième série d'essais l'extrait enzymatique est porté à différentes températures pendant 15 minutes et l'activité coagulante testée.

Le tableau XXIII et la Fig. 5 qui rendent compte des résultats font ressortir une diminution de l'activité coagulante en fonction de la température de chauffage pendant un temps donné, cette activité étant totalement inhibée par un chauffage de 15 minutes à 80°C.

mps de coagulation

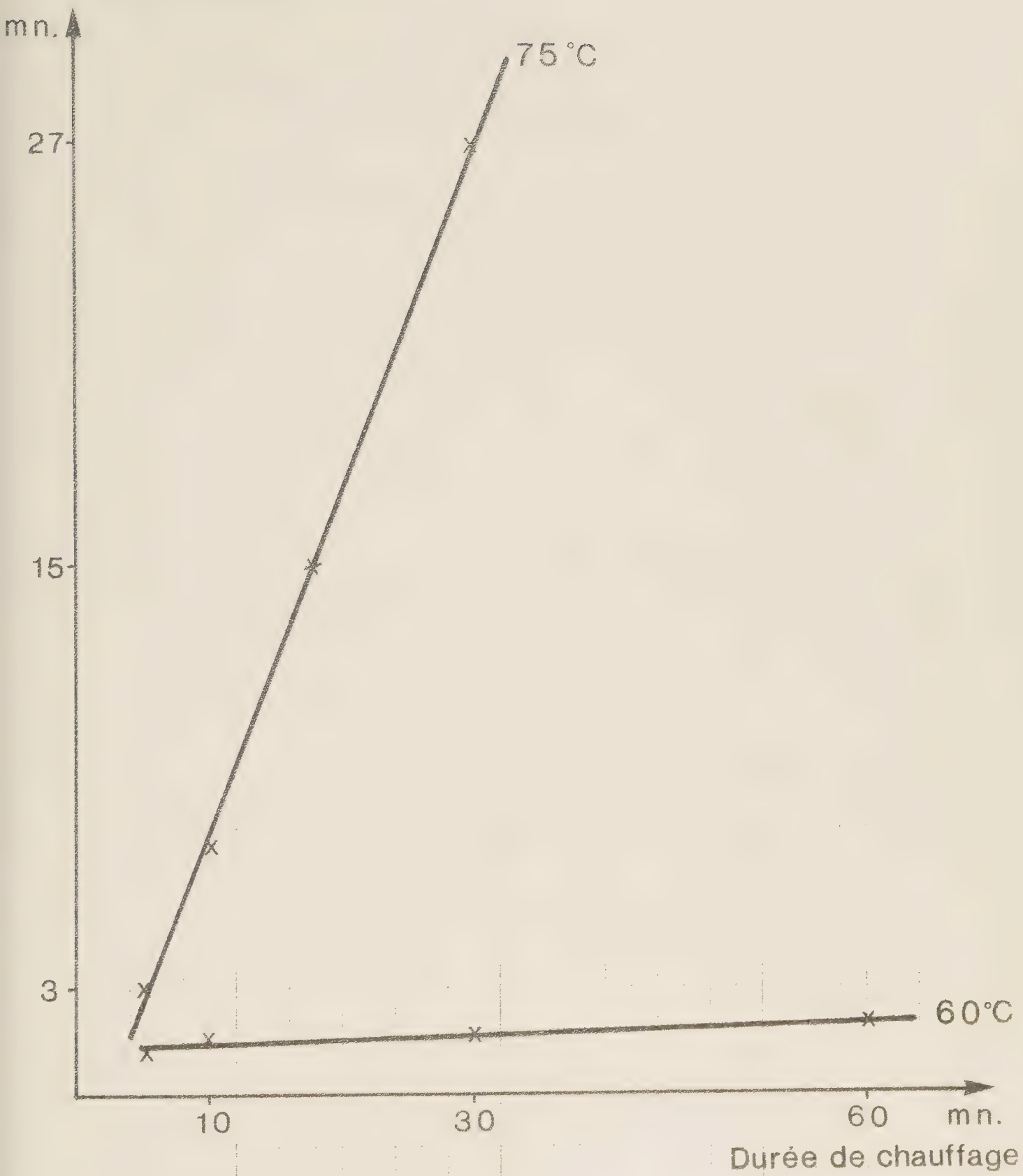


Fig. 4

Tableau XXIII

Influence du chauffage pendant un temps donné
à différentes températures

Températures de chauffage en ° C	Temps de chauffage 15 minutes	Activité coagulante à 30°C (en minutes)
	70	3
	75	7
	80	supérieur à 60

2.2.2.1.3. Influence du pH sur l'activité coagulante

L'extrait enzymatique est porté à différentes valeurs de pH et ramené ensuite à pH 8 pour effectuer le test de coagulation. Les pH basiques de 9 et 11 sont obtenus avec NaOH. N/10. Les pH acides de 2 et 5 avec HCl. N/10. Nous rappelons que le pH initial de l'extrait enzymatique en tampon véronal est de 8.

Le tableau XXIV et la Fig. 6 qui représentent les résultats obtenus montrent la stabilité de l'activité coagulante aux pH basiques tandis que nous observons une inhibition aux pH acides.

Tableau XXIV

Influence du pH sur l'activité coagulante

Valeur du pH	Activité coagulante à 30°C (en minutes)
2	plus de 60
5	12
8	3
9°	3
11	3

mps de coagulation

m n.



Fig.5

mps de coagulation

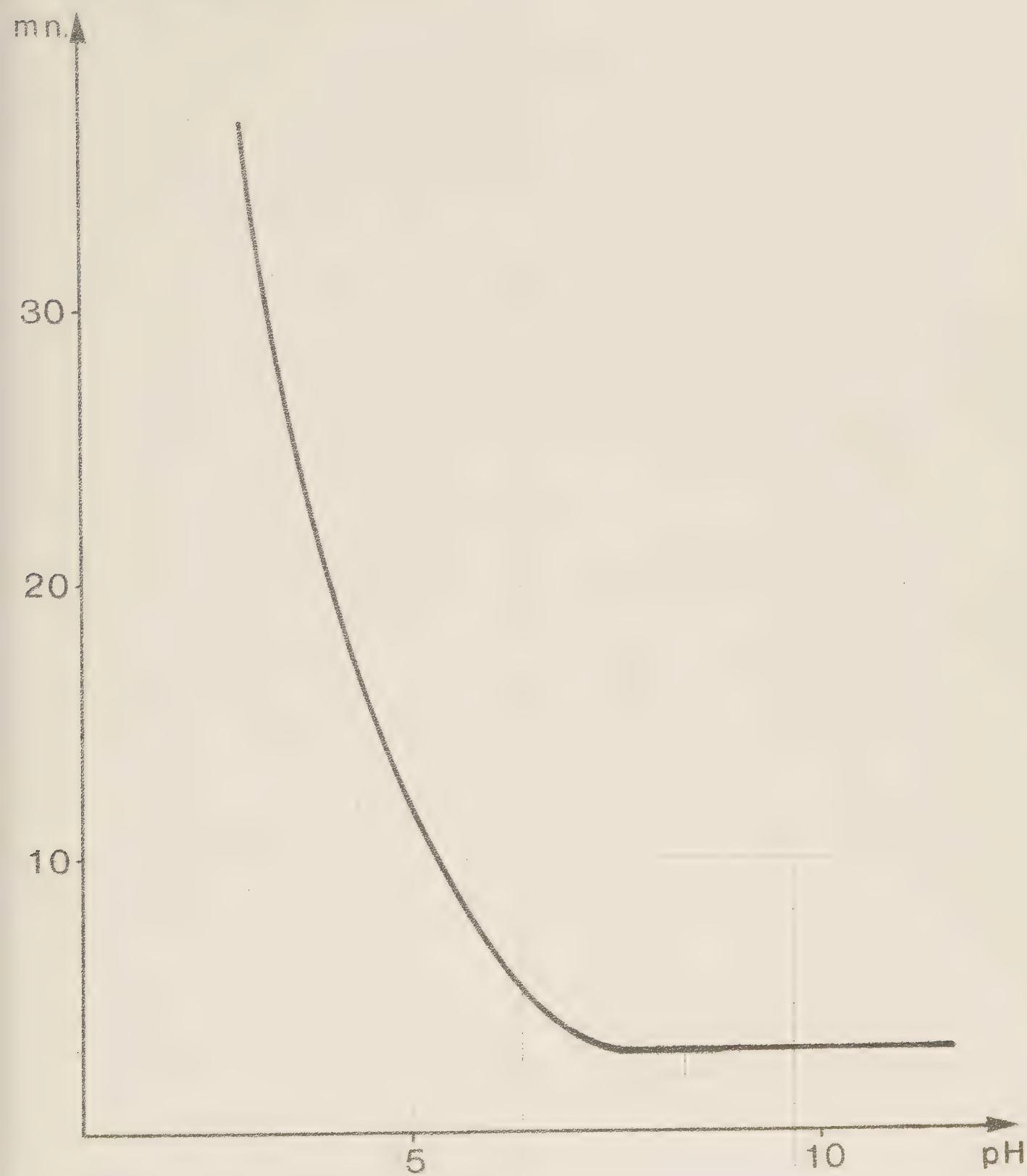


Fig. 6

2.2.2.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique exprimée par la D.O. à 660 nm est de 1,548, ce qui correspond à une concentration de 1,25 mg/ml en tyrosine.

2.2.2.2.1. Influence de la température

L'activité protéolytique est testée à 30°C, 40°C, 50°C et 60°C pendant 10 minutes. Le tableau XXV et la Fig. 7 qui donnent les résultats obtenus montrent qu'à une élévation de la température correspond une augmentation de l'activité protéolytique.

Tableau XXV

Influence de la température sur l'activité protéolytique

Température en ° C	Activité protéolytique	
	D.O. à 660 nm	mg/ml en tyrosine
30	1,115	0,94
40	1,535	1,29
50	1,625	1,37
60	1,682	1,42

2.2.2.2.2. Influence du pH

Pour déterminer quelle peut-être l'influence du pH sur l'activité protéolytique, nous effectuons le test de protéolyse sur la caséine Hammersten en solution à différents pH.

La caséine est portée à un pH de 7,3 à 8,6 en tampon Tris-HCl 0,2 M et à un pH de 9,1 et 10 en tampon carbonate-bicarbonate 0,2 M.

O. à 660 nm.

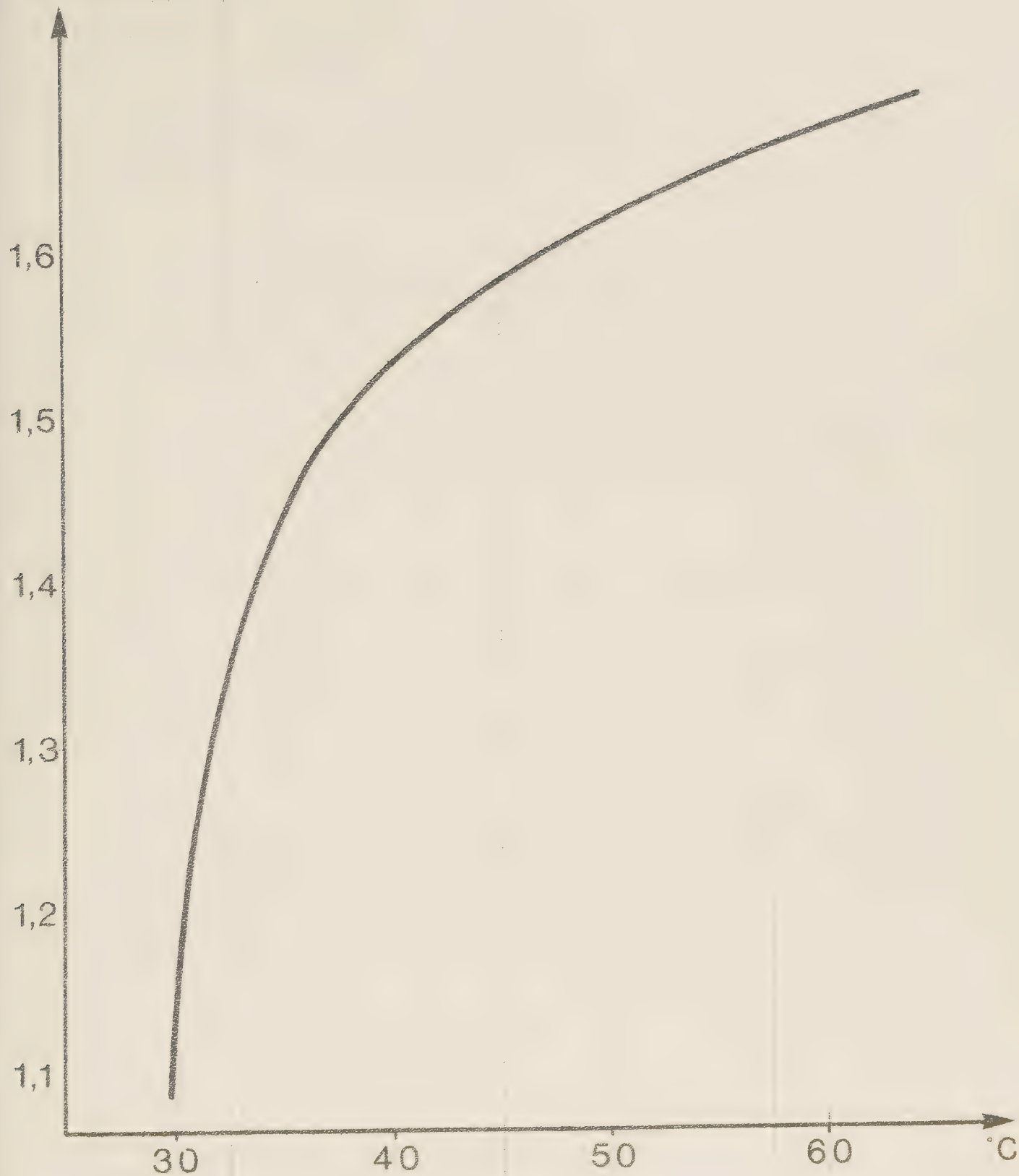


Fig. 7

Le tableau XXVI et la Fig. 8 montrent qu'à un pH inférieur à 8 ou supérieur à 8,4 l'activité protéolytique diminue. C'est donc aux environs de pH 8,2 - 8,4 que l'activité protéolytique est maxima.

Tableau XXVI
Influence du pH sur l'activité protéolytique

	Activité protéolytique	
	D.O. 660 nm	mg/ml en tyrosine
7,3	0,868	0,73
7,7	1,325	1,11
8,2	1,545	1,30
8,4	1,567	1,32
8,6	1,529	1,29
9,1	1,321	1,12
10	1,026	0,86

Nous venons de confirmer, par l'étude encore sommaire de son système enzymatique coagulant et protéolytique, qu'Aeromonas hydrophila ELP 5 est une bactérie caséolytique, mais cette action caséolytique est limitée en fonction de la température et du pH.

O. à 660 nm.

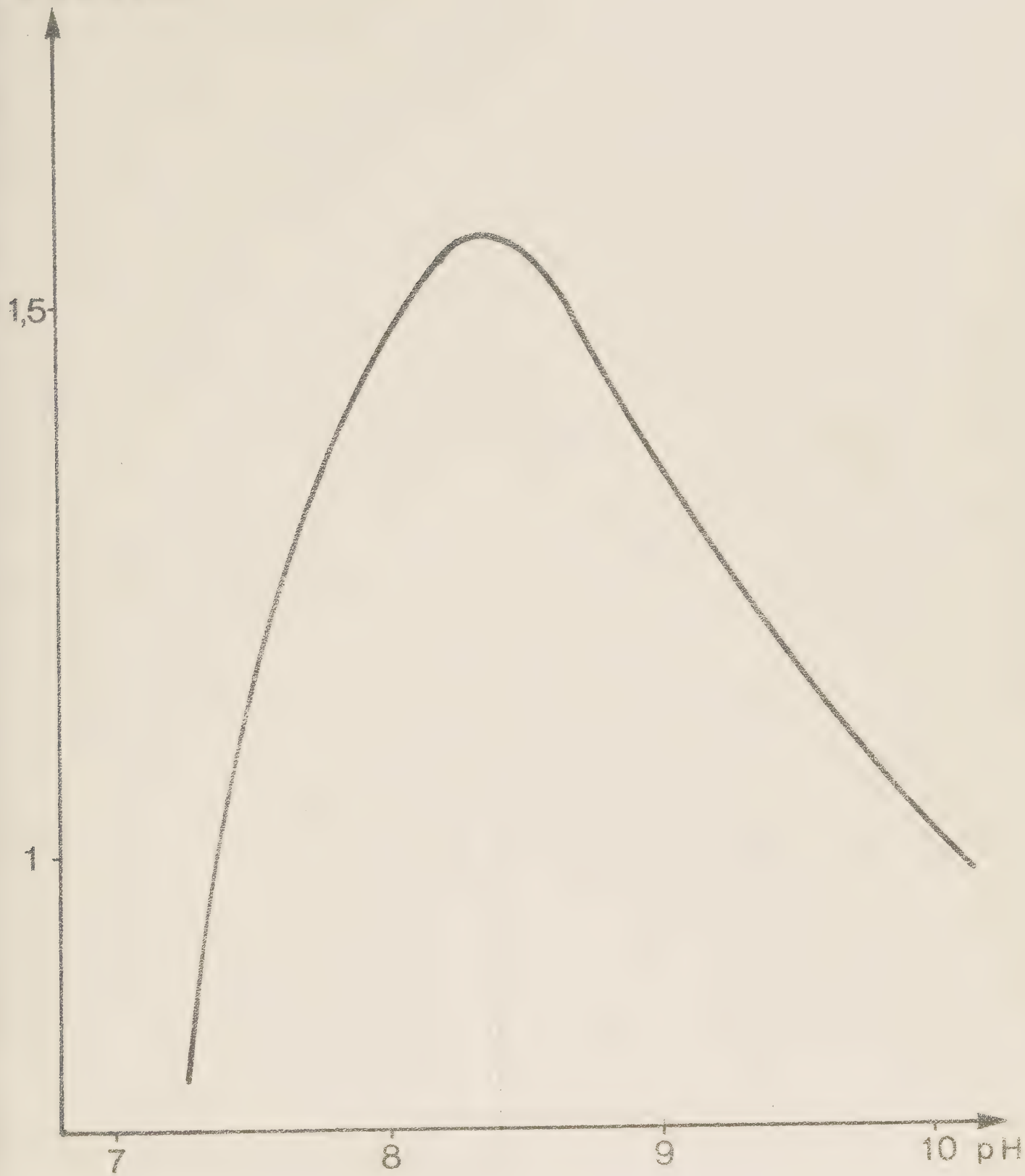


Fig.8

DISCUSSION

1. QUALITE BACTERIOLOGIQUE DES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES CONTROLES

Le traitement thermique subi par le lait pasteurisé permet l'élimination des microorganismes pathogènes ainsi que celle d'un grand nombre de microorganismes d'altération. Un lait correctement pasteurisé et conditionné, provenant d'un atelier bien entretenu et animé par un personnel compétent et soucieux de la qualité du produit, est livré à la consommation sans risque de contamination microbienne dangereuse.

En France, le contrôle des laits pasteurisés est régi par des textes (165) et ces laits, pour être conformes à la législation, doivent répondre, nous l'avons vu, à certaines normes : si le degré de chauffage du lait est évalué indirectement par la recherche de la phosphatase, seul le contrôle bactériologique permet de tester une recontamination après pasteurisation, et c'est là un point important. Il est certain que pour le législateur la présence de quelques coliformes ou indologènes dans 1 ml témoigne d'une contamination suspecte.

Les bactéries coliformes et la plupart des bactéries indologènes décelées jusqu'à ce jour dans les laits pasteurisés appartiennent au grand groupe de bactéries en forme de bâtonnets Gram-négatives qui, à l'exception d'Alcaligenes tolerans (1) (bactérie anindologène non dangereuse) sont thermolabiles. Cependant, si E. coli est détruit par la pasteurisation dans le lait et les produits laitiers (268), ESTEVES (96) signale des souches thermorésistantes isolées du lait cru ; en ce qui concerne les échantillons de lait pasteurisé contrôlés, il ressort que les E. coli isolés sont thermolabiles. Mais en 1970, HORB (154) isole des laits pasteurisés conditionnés dans la région de Strasbourg des Plectridia indologènes, bactéries sporulées, anaérobies, thermorésistantes. Notre étude porte sur les bactéries aéroanaérobies indologènes : nous devons préciser qu'à partir des 288 échantillons de lait qui présentent une réaction positive lors de la recherche de l'indole sur une culture de 48 ou de 96 heures (après repiquage) en E. P., nous retrouvons toujours les bactéries indologènes ; à partir de tout échantillon contaminé par des bactéries indologènes, nous avons toujours obtenu une identification de bactérie aéro-anaérobie : si donc il y a présence de Plectridium indologène, il s'agit d'une association bactérie aéro-anaérobie et bactérie anaérobie indologènes.

Puisqu'aucune des bactéries indologènes isolées ne présente une thermorésistance (63° C - 30 minutes), que nous sommes assurée que le traitement thermique subi par nos échantillons est correct et qu'il n'y a pas apport de lait cru dans le lait traité (absence de phosphatase), les bactéries indologènes identifiées sont des bactéries de recontamination après pasteurisation.

Si, sur 507 échantillons contrôlés, 308 contiennent des coliformes dénombrés sur D. L. A., nous trouvons 64 échantillons parmi ces 308, qui sont contaminés par E. coli (133), (215) : or, 13 échantillons sur ces 64 donnent un dénombrement de coliformes inférieur à 10

dans 1 ml de lait cultivé sur D. L. A. et une culture indologène sur E. P. ; sachant qu'E. coli est la seule bactérie parmi les coliformes qui témoigne avec certitude d'une contamination d'origine fécale, donc pouvant être dangereuse, il nous paraît très important de tenir compte de ces résultats, dans la mesure où un dénombrement de coliformes inférieur à 10 dans 1 ml de lait pasteurisé est retenu comme critère de qualité bactériologique acceptable.

Parmi les 288 échantillons contaminés par des bactéries indologènes, nous retrouvons les 64 contaminés par E. coli.

Si nous considérons que Proteus (79) est une bactérie de contamination d'origine organique et qui, de ce fait, peut témoigner d'une contamination suspecte, nous pensons que la présence de Proteus dans le lait pasteurisé peut avoir la même signification que la présence d'E. coli ; or, il se trouve que dans les 10 échantillons où nous identifions Proteus, nous trouvons aussi E. coli : le calcul du $\chi^2 = 31,7$ confirme que la contamination par Proteus et la contamination par E. coli sont liées.

Dans la comparaison faite (p. 52) entre la contamination par E. coli et la contamination par Klebsiella indologène, nous montrons aussi par le calcul du χ^2 que les deux contaminations sont liées.

Ces résultats nous amènent donc à considérer les échantillons contaminés par E. coli, Proteus et Klebsiella indologène comme étant de qualité bactériologique suspecte, et ainsi 120 échantillons sur les 288 contaminés par des bactéries indologènes entrent dans la catégorie de lait pasteurisé de mauvaise qualité bactériologique. En effet, la présence de bactéries d'origine fécale ne peut pas être tolérée dans des laits pasteurisés.

Restent 168 échantillons contaminés par d'autres bactéries indologènes : 3 le sont par Citrobacter intermedium et Bethesda,

2 par Providencia, bactéries que nous ne pouvons pas considérer comme témoignant d'une contamination dangereuse et 163 par Aeromonas. La fréquence des Aeromonas dans les laits pasteurisés conditionnés en Meurthe-et-Moselle est surprenante.

Les nombreux travaux rapportés par la Commission des Analyses Microbiologiques de la Fédération Internationale de Laiterie (F. I. L.) ne signalent jamais ce type de bactérie parmi les bactéries indologènes : THIEULIN et BASILLE, en 1961, dans le Document 13 de la F. I. L. sur la "Numération des germes coliformes dans le lait et les produits laitiers" mentionnent que les espèces indologènes capables de proliférer à 37° C sont "fort disséminées dans la systématique", sans plus de précisions. Dans les travaux publiés ces dernières années tant en France qu'à l'Etranger sur la bactériologie des laits pasteurisés (13) (14) (21) (30) (53) (65) (72) (101) (118) (170) (222) (228) (235) (238) (239) (272) (337) (341) (360) Aeromonas n'y figure jamais : seul KIELWEIN (173), en 1971, trois ans après nous (350) rapporte que dans 27 laits pasteurisés sur 277 contrôlés, il isole 6 souches d'Aeromonas hydrophila et 21 souches d'Aeromonas hydrophila ssp anaerogenes.

Comme il n'est pas encore possible de démontrer que les Aeromonas témoignent d'une contamination dangereuse, nous accordons à leur présence dans les laits pasteurisés la même signification que celle de Citrobacter intermedium et d'Enterobacter aerogenes, coliformes non dangereux les plus fréquemment isolés de nos échantillons et qui sont le signe d'une recontamination après pasteurisation. Demeure la présence de Klebsiella anindologène dont l'interprétation prête à discussion.

A la suite des résultats obtenus, deux questions se posent : comment expliquer la méconnaissance des Aeromonas dans les laits pasteurisés, et d'où proviennent-ils ?

Pour essayer de répondre, nous envisageons d'une part les coliformes et Aeromonas et d'autre part l'origine des Aeromonas des laits pasteurisés conditionnés.

2. COLIFORMES ET AEROMONAS

Les coliformes regroupent des bactéries ayant ensemble quelques caractères communs qui, selon BREED et NORTON, sont des bactéries "aéro-anaérobies, Gram négatives, non sporulées, capables de fermenter le lactose avec production de gaz" (Document 13, 1961, F.I.L.). Une telle définition laisserait supposer qu'un certain nombre de nos souches d'Aeromonas entreraient dans cette catégorie, ce qui permet de penser que ces auteurs ignoraient les Aeromonas.

Les Aeromonas isolés de nos échantillons de lait sont, comme les coliformes, des bactéries fermentantes qui possèdent une β -galactosidase mais qui, comme les Pseudomonas, ont une ciliature polaire et possèdent cytochrome-oxydase et oxydase.

Si certains caractères des Aeromonas permettent de les rapprocher des Enterobacteriaceae, les études comparatives entre Aeromonas et Serratia (20), Aeromonas et Paracolobactrum (219) écartent l'éventualité de les intégrer parmi les Enterobacteriaceae; les récents travaux de LE MINOR et coll. (202) qui sont consacrés à la recherche de l'antigène commun, AC, chez un certain nombre de bactéries concluent à l'absence d'AC chez Aeromonas, exception faite chez Aeromonas shigelloides exclu du genre Aeromonas par EDDY et CARPENTER en 1964 pour devenir Plesiomonas shigelloides. Ces arguments associés à la présence d'une ciliature polaire, de cytochrome-oxydase et d'oxydase sont en faveur du maintien du genre Aeromonas parmi les Pseudomonadaceae.

Il n'en demeure pas moins qu'en pratique courante de bactériologie laitière, comme en bactériologie des eaux (189) (193), ces Aeromonas simulent les coliformes et sont une cause d'erreur aussi bien lors du dénombrement sur D. L. A. que dans la recherche des coliformes sur V. B.

De plus, les colonies d'Aeromonas hydrophila sur les milieux G. P. B. et D. C. L. ont un aspect tel qu'il n'est pas possible de les différencier de celles d'Enterobacter, pas plus que les colonies d'Aeromonas punctata ne peuvent l'être de celles d'E. coli ou de Citrobacter.

Par ailleurs, nous constatons que la sensibilité aux antibiotiques des différents types d'Aeromonas isolés et d'E. coli nous permet de dire que le comportement de ces Aeromonas et d'E. coli à l'égard des antibiotiques étudiés est le même à l'exception de l'ampicilline (Totapen) qui inhibe le développement d'E. coli et permet la croissance de nos Aeromonas ; cela nous conduit à l'étude, encore en cours, d'un milieu de culture sélectif en vue du contrôle bactériologique du lait, de la même façon que SCHUBERT propose, en 1967, un milieu de culture permettant l'isolement des Aeromonas lors du contrôle bactériologique des eaux (292), sans omettre que KIELWEIN en 1969 (172) décrit un milieu de culture permettant de distinguer Pseudomonas d'Aeromonas : cette technique que KIELWEIN essaie d'utiliser en 1971 pour différencier Pseudomonas d'Aeromonas dans le lait pasteurisé (173) ne lui paraît pas satisfaisante.

Enfin, il faut signaler que la dernière née parmi les bactéries indologènes des Enterobacteriaceae, Levinea (271), décrite il y a peu de temps, n'est pas isolée de nos échantillons de lait.

Aucune confusion possible ne peut être faite entre les Aeromonas que nous isolons et les Entérobactéries indologènes, dans la mesure où l'identification de ces bactéries est correctement conduite.

3. ORIGINE DES AEROMONAS DES LAITS PASTEURISES CONDITIONNES

Puisqu'il est prouvé que les Aeromonas isolés proviennent d'une recontamination du lait après pasteurisation, comment et où se fait cette recontamination ?

Nous pensons que les surfaces des appareils avec lesquelles le lait entre en contact au cours du traitement thermique et du conditionnement sont exceptionnellement amicrobiennes : on ne peut jamais être sûr qu'un matériel, même soumis à un nettoyage efficace, à une bonne aseptisation et à un rinçage rigoureux ne contient pas encore quelques bactéries. Il est important de signaler que les Aeromonas, sensibles aux valeurs acides de pH (inhibition de la croissance à un pH inférieur à 5,5) peuvent proliférer en milieu alcalin et sont moins sensibles au chlore que les Enterobacteriaceae.

A la suite des travaux de LECLERC (189), de LECLERC et BUTTIAUX (193) et de SCHUBERT (292), nous savons que les eaux de distribution, donc considérées comme potables, contiennent des Aeromonas.

Nos recherches sur les bactéries aéro-anaérobies indoligènes des laits pasteurisés conditionnés sont alors complétées par plusieurs contrôles des eaux utilisées dans deux ateliers de pasteurisation que nous connaissons comme travaillant dans de bonnes conditions d'hygiène : le résultat de ces contrôles est probant : nous mettons en évidence dans l'eau et dans le lait pasteurisé les mêmes espèces d'Aeromonas. Il y a quelques semaines à peine, deux ateliers qui fournissent du lait pasteurisé conditionné dont le dénombrement de colonies de bactéries aérobies mésophiles est de quelques centaines par ml et celui des coliformes nul sur D. L. A., se trouvent en infraction avec la législation parce que la réaction à l'indole s'avère positive

après culture de 1 ml de lait à 37° C pendant 48 heures. Les prélèvements d'eau aussitôt effectués et contrôlés révèlent la présence d'Aeromonas hydrophila que nous identifions aussi dans les échantillons de lait, à l'exclusion de toute Entérobactérie. Cette eau, qui est une eau de distribution traitée, ne peut pas être considérée autrement que comme potable alors que chaque jour des dizaines de milliers d'habitants l'utilisent et la consomment et que rien ne laisse supposer que les services d'hygiène soient alertés puisqu'aucun avis de précautions particulières à prendre n'informe la population. Nous pouvons affirmer que l'eau livrée à la consommation véhicule des Aeromonas, et nous sommes convaincue que ces Aeromonas recontaminent le lait après pasteurisation.

La façon dont cette recontamination peut se faire nous paraît simple : quelques gouttes d'eau qui stagnent, après rinçage, au niveau des joints, de la tuyauterie et de toute surface du matériel de pasteurisation suffisent à contaminer le lait qui se trouve à leur contact, et dans la mesure où ces Aeromonas peuvent proliférer, la contamination peut être importante. Nous retrouvons ces Aeromonas dans les laits pasteurisés, quel que soit leur conditionnement : carafe de verre, matière plastique, carton paraffiné ou revêtu d'un mince film de matière plastique.

Voulant nous rendre compte si, hors de Meurthe-et-Moselle, les laits pasteurisés conditionnés sont aussi contaminés par des Aeromonas, la Station de Biologie Marine de Roscoff met à notre disposition pendant 10 semaines un laboratoire dans lequel nous transportons de Nancy tout le matériel nécessaire (étuves comprises) pour mener à bien le contrôle bactériologique de 68 échantillons de lait pasteurisé diversement conditionné et provenant de trois ateliers : pendant ce séjour, nous effectuons les contrôles et les isollements dans les conditions précisées dans les chapitres II et III, les identifications

étant faites à notre retour à Nancy. Les résultats obtenus mettent en lumière que l'un des ateliers fournit un lait pasteurisé conditionné de très mauvaise qualité bactériologique : dans 18 échantillons sur 23, nous identifions E. coli ; dans 3 échantillons nous découvrons Aeromonas punctata.

Le deuxième atelier livre un très bon produit : nous identifions Aeromonas hydrophila et Aeromonas punctata à partir de 6 échantillons sur 22. Le troisième atelier qui offre à la consommation un lait pasteurisé conditionné de qualité très variable puisque dans 5 échantillons sur 23 nous retenons la présence d'E. coli à côté d'échantillons de qualité bactériologique très acceptable : Aeromonas hydrophila ssp anaerogenes est identifié 3 fois et Aeromonas punctata ssp. caviae 2 fois.

Lors du contrôle bactériologique de l'eau utilisée dans l'un des ateliers, nous décelons les Aeromonas trouvés dans le lait : les prélèvements d'eau dans les deux autres ateliers n'ont pas été effectués.

S'il n'est pas possible de comparer statistiquement les résultats obtenus en Meurthe-et-Moselle et en Nord-Finistère, l'échantillonnage étant trop différent, il ressort que les Aeromonas sont bien des germes indologènes contaminants du lait pasteurisé conditionné et que l'eau est vraisemblablement à leur origine.

SCHUBERT n'observe-t-il pas que les siphons d'évier (292), donc pourquoi pas les coudes de tuyauterie, sont un repaire d'Aeromonas ?

4. AEROMONAS, BACTERIE COAGULANTE, PROTEOLYTIQUE ET PSYCHROTROPHE

Depuis une quinzaine d'années, en raison de la pénurie de présure animale sur le marché international, les microbiologistes

et quelques biochimistes orientent leurs recherches vers les enzymes d'origine microbienne capables de coaguler le lait (114).

Des essais d'isolement et de purification d'enzyme coagulante sont tentés à partir de cultures de moisissures telles que Aspergillus niger (245), Aspergillus orizae (346), Endothia parasitica (281), Mucor pusillus var. Lindt (7), Rhizopus oligosporus (354) : les travaux de SARDINAS (281) aboutissent à l'isolement et à la purification d'une enzyme aux propriétés voisines de celles de la présure d'origine animale à partir de cultures d'Endothia parasitica.

Par ailleurs, des recherches sont entreprises sur les enzymes protéolytiques d'origine bactérienne, telles que celles élaborées par Aeromonas proteolytica, bactérie marine (127) (205), Bacillus subtilis (264), Micrococcus caseolyticus (77), Pseudomonas lachrymans (169) (170), Serratia marcescens (277), Streptococcus faecalis var. liquefaciens (318).

Enfin, quelques publications sur les enzymes coagulantes d'origine bactérienne comme celles de Bacillus subtilis (320) (346) et de Bacillus cereus (225) (320) nous montrent combien est d'actualité le problème des enzymes coagulantes et protéolytiques dans l'optique de succédanés de la présure d'origine animale.

Or, l'étude de l'action sur le lait de nos souches fait ressortir que la coagulation observée après mise en culture sur lait est d'origine enzymatique et que ces bactéries entrent dans la catégorie des "caséolytiques". Cependant, même après un séjour de 3 semaines à 5°C, quelques souches s'avèrent franchement protéolytiques et peu coagulantes. Nous pensons que cela provient en grande partie du fait que nous testons l'action coagulante et protéolytique de nos souches non sur du lait cru mais sur du lait écrémé reconstitué stérilisé. Or, la stérilisation, en modifiant les propriétés physico-chimiques du lait,

entraîne une diminution de l'aptitude du lait à coaguler et de ce fait entrave le pouvoir coagulant et protéolytique du système enzymatique étudié. Si l'addition d'ions Ca^{++} au lait rétablit quelque peu le pouvoir coagulant, et s'il est certain qu'à 5° C les réactions enzymatiques sont ralenties, il est regrettable de ne pouvoir disposer d'un lait frais amicrobien qui nous permettrait d'évaluer avec beaucoup plus de rigueur l'action du système enzymatique coagulant et protéolytique de nos souches aux basses températures.

Néanmoins, la culture sur lait de nos Aeromonas suivie d'un dénombrement après 10 jours d'incubation à 5° C prouve que ces bactéries prolifèrent à cette température comme elles prolifèrent sur milieux de culture artificiels : nos Aeromonas sont donc des bactéries psychrotrophes ou psychrophiles, selon la terminologie adoptée. La discussion de cette terminologie (84) (166) aboutit à l'adoption en 1969, par la F. I. L., lors du colloque sur les "psychrophiles du lait", du terme psychrophiles pour désigner les microorganismes qui sont capables de proliférer à 7° C ou moins, indépendamment de leur température optima de croissance : nos Aeromonas font donc partie des psychrophiles du lait.

Parmi les nombreux travaux publiés concernant la flore psychrophile du lait (1) (21) (55) (56) (72) (139) (186) (187) (222) (230) (247) (339) (346), DEMPSTER seul (74) en 1968 signale que 6,3 % des microorganismes psychrophiles du lait cru sont des Aeromonas et que 9,8 % des psychrophiles de la crème pasteurisée appartiennent au genre Aeromonas ; DEMPSTER ne met pas en évidence d'Aeromonas dans le lait pasteurisé et autres produits laitiers. Cependant, il faut signaler que DEMPSTER donne des pourcentages correspondant à un échantillonnage restreint : peut-on conclure à l'absence d'Aeromonas lorsque l'échantillonnage du produit étudié est de quelques unités ? THOMAS et coll., en 1969, dans une revue bibliographique concernant

les bactéries psychrophiles du lait (341) cite que SCHOLEFIELD, en 1963, considère que 2,5 % de la flore psychrophile du lait cru est constitué d'Aeromonas. Mais la majeure partie des publications consultées concernant les psychrophiles du lait témoignent de peu de précisions : elles rapportent surtout des résultats de dénombrement et d'identifications bactériennes superficielles montrant que ces psychrophiles sont essentiellement des Pseudomonas, pigmentés ou non.

Donc, les Aeromonas, bactéries psychrophiles et caséolytiques peuvent intervenir, comme les Pseudomonas, dans l'altération des laits réfrigérés.

En étudiant de façon plus approfondie le système enzymatique coagulant et protéolytique chez une de nos souches, nous observons qu'en fonction du milieu de culture utilisé l'induction de ce système varie : il ressort que les milieux riches en acides aminés (à base de "casaminoacides" ou d'hydrolysats de caséine) ne permettent pas la synthèse de ce système enzymatique alors que les milieux riches en peptides ("Polypeptone" ou Bacto-casitone") induisent la synthèse de ce système. De tels résultats concordent avec ceux obtenus par GRIFFIN étudiant les protéinases d'Aeromonas proteolytica (127) et par DESMAZEAUD et HERMIER à la suite de leurs recherches sur les enzymes protéolytiques de Micrococcus caseolyticus (76). Il y aurait donc une relation entre l'induction du système enzymatique et la structure chimique du substrat.

LITCHFIELD et PRESCOTT (205), dans leur étude de la production du système enzymatique d'Aeromonas proteolytica, mentionnent que la présence de glucose dans le substrat réprime la synthèse de ce système alors que nous observons l'inverse pour ce qui concerne Aeromonas hydrophila ELP 5 : cependant, lors de nos essais, nous observons que l'addition au substrat de glucose à une

concentration de 5 ‰ entraîne une acidification telle qu'elle ralentit la synthèse du système enzymatique coagulant et protéolytique : la concentration en glucose du substrat de 1 ‰ nous paraît la meilleure car elle entraîne une croissance plus intense et par là même une production plus importante du système enzymatique.

Le fait que le maximum de production de ce système s'obtienne après 72 heures de culture à 30° C nous amène à penser que c'est pendant la phase stationnaire de croissance que ce système devient extracellulaire et on peut se demander si ce processus n'est pas en relation avec les modifications de structure observées au niveau de la membrane cytoplasmique pendant cette phase de la croissance. Au-delà de 72 heures, le fait de retrouver moins de système enzymatique ou un système enzymatique ayant perdu une partie de son activité, peut s'expliquer par l'inactivation du système provoquée par les produits issus du métabolisme bactérien ou par les substances provenant de l'autolyse cellulaire.

L'activité coagulante du système enzymatique, immédiate à 75° C, rapproche ce système de celui de Bacillus cereus dont MELACHOURIS et TUCKEY (225) situent la température optima d'action entre 75° C et 80° C et concorde avec les propos de POLLOCK sur les protéases d'origine bactérienne dont il situe la température optima d'action aux environs de 70° C (259). La sensibilité de cette activité coagulante aux ions Ca^{++} est en accord avec les études d'ARIMA et coll. (7) sur la protéase de Mucor pusillus var. Lindt et celles de WANG (354) sur la protéase de Rhizopus oligosporus.

Si l'activité protéolytique du système enzymatique de la souche d'Aeromonas étudiée montre une activité accrue par une élévation de la température, cette activité tend à se stabiliser entre 50 et 60° C. Le maximum d'action de ce système qui s'observe pour des valeurs de pH comprises entre 8,2 et 8,6 nous amène à le placer

parmi les protéases alcalines, ce qui le différencie et de la présure d'origine animale et des protéases d'origine fongique.

Si, dans notre travail, nous parlons de système enzymatique c'est parce que seule la réalisation d'essais de séparation peut nous permettre d'affirmer avec certitude qu'il s'agit d'une ou plusieurs enzymes : c'est là une des voies dans laquelle nous pensons orienter une partie de nos recherches.

CONCLUSION

L'étude systématique des bactéries indologènes isolées des laits pasteurisés conditionnés en Meurthe-et-Moselle nous conduit à la conclusion que la flore bactérienne indologène des échantillons contrôlés est constituée, par ordre de fréquence, par Aeromonas punctata ssp. caviae, Aeromonas hydrophila, Aeromonas punctata, Aeromonas hydrophila ssp. anaerogenes, Klebsiella, E. coli, Proteus, Providencia, Citrobacter intermedium, Bethesda.

L'étude statistique nous montre que la présence des Aeromonas n'est pas liée à celle des Entérobactéries indologènes alors qu'il semble bien que la présence de Klebsiella indologène, celle d'E. coli et celle de Proteus sont liées. Cela nous prouve que les Aeromonas et ces Entérobactéries n'ont pas la même origine et par là même l'interprétation de leur présence dans les laits pasteurisés conditionnés ne peut être identique. Dans la mesure où E. coli, Proteus, Klebsiella indologène sont d'origine fécale, leur présence témoigne d'une contamination risquant d'être dangereuse. Par contre, comme il n'est pas possible, en l'état actuel de nos connaissances, de considérer les Aeromonas isolés comme pathogènes, leur présence ne peut que témoigner d'une recontamination après pasteurisation sans pour cela conférer au lait pasteurisé conditionné contrôlé une qualité bactériologique inacceptable : si nous devons admettre que ces Aeromonas sont le signe d'une contamination

suspecte ou dangereuse, il nous paraît du plus haut intérêt de reconsidérer le problème de la qualité bactériologique des eaux de distribution. De toute façon, il nous semble souhaitable d'approfondir le problème des Aeromonas du point de vue de la santé publique, les recherches en ce domaine demeurant peut-être insuffisantes.

De plus, nous pensons que si les Aeromonas sont souvent isolés des laits pasteurisés conditionnés, il est très important de signaler qu'ils font partie de la flore bactérienne contaminante des laits crus réfrigérés. En tant que bactéries psychrophiles, caséolytiques et lipolytiques, ces Aeromonas, comme les Pseudomonas, sont à l'origine de l'altération de la structure physico-chimique de ces laits ; cette altération, qui n'a pas d'incidence sur la santé du consommateur, risque par contre de présenter des inconvénients dans les industries de transformation du lait, et plus particulièrement en fromagerie. D'autre part, si le traitement de pasteurisation utilisé en fromagerie élimine les Aeromonas, leurs enzymes protéolytiques ne sont pas inactivées et peuvent jouer un certain rôle dans les processus de fabrication, de maturation et de conservation.

Par ailleurs, ces Aeromonas, sensibles au milieu acide mais beaucoup moins sensibles au milieu alcalin et aux composés chlorés, résistent mieux que les Entérobactéries à certains produits de nettoyage et d'aseptisation utilisés dans les ateliers de traitement ou de transformation du lait, ce qui peut expliquer en partie leur fréquence dans les laits pasteurisés conditionnés.

Enfin, qu'il nous soit permis d'émettre le vœu de voir bientôt la législation concernant le contrôle bactériologique des laits pasteurisés conditionnés subir des modifications fondées sur des critères bactériologiques valables.

ANNEXE

A_1

Titration de l'acide lactique du lait par la méthode
de Dornic

Dans un bécher de 50 ml, introduire 10 ml de lait à tester.

Ajouter 0,1 ml d'une solution de phénolphtaléine à 1 %
dans l'alcool à 95°.

Titrer en exprimant la teneur en acide lactique par la
quantité de soude N/9 (soude Dornic) nécessaire pour obtenir le virage
de la phénolphtaléine.

1 degré Dornic (1° D) correspond à 1 mg d'acide lactique,
dans 10 ml de lait, neutralisé par 0,1 ml de soude N/9 en présence
de phénolphtaléine.

A₂Coloration de Gram modifiéepar BURKE-KOPELOVSolutions et colorants :

A	(Cristal violet	1	g
	(Eau distillée	100	ml
B	(Bicarbonate de sodium	5	g
	(Eau distillée	100	ml
C	(Iode	0,5	g
	(Iodure de potassium	1	g
	(Eau distillée	100	ml
D	(Acétone	75	ml
	(Ether sulfurique	25	ml
E	(Safranine	0,5	g
	(Eau distillée	100	ml

Mode opératoire :

- 1°/ Fixer le frottis par la chaleur
- 2°/ Recouvrir la préparation avec la solution A et ajouter immédiatement 3 à 5 gouttes de la solution B. Laisser en contact 2 minutes.
- 3°/ Laver rapidement et couvrir de la solution C. Laisser en contact 1 minute.
- 4°/ Laver rapidement
- 5°/ Différencier avec le mélange D jusqu'à ce que le 1 liquide coule clair.
- 6°/ Laver rapidement.
- 7°/ Recolorer avec la solution E.
- 8°/ Laver et sécher.

A₃

Milieu de culture liquide permettant la mise en
évidence de la production d'H₂S

Bacto-tryptone (Difco)	10	g
Cystine	0,2	g
NaCl	5	g
Citrate de Fer ammoniacal	0,5	g
KH ₂ PO ₄	1,5	g
Na ₂ H PO ₄ , 12 H ₂ O	9	g
H ₂ O (distillée)	1 000	ml

Dissoudre par chauffage

Distribuer en tubes de 160 x 16 mm

Stériliser à 120°C pendant 20 minutes.

A₄

Méthode de l'étude de l'utilisation des acides
aminés comme seule source de carbone par Aeromonas

1. Milieu :

SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,2 g
NH ₄ PO ₄ H ₂	1 g
K ₂ PO ₄ H	1 g
NaCl	5 g
Solution de bleu de bromothymol à 1,6 %	5 ml
H ₂ O (distillée)	1 000 ml

Ajouter l'acide aminé à étudier à une concentration de 0,2 à 0,4 %.

Ajuster à pH 7.

Distribuer 10 ml en tubes de 160 x 16 mm ou 125 ml en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml.

Stériliser à 120° C pendant 20 minutes.

2. Culture :

Prélever au fil de platine, à partir d'une culture de 24 heures sur milieu gélosé nutritif, un peu de la culture avec d'infinies précautions pour éviter de prélever la moindre parcelle de milieu avec l'inoculum.

Incuber à 30°C pendant 7 à 10 jours en observant de 24 heures en 24 heures.

L'utilisation de l'acide aminé étudié se manifeste par l'alcalinisation du milieu.

A₅

Technique utilisée pour la mise en évidence de la déshydrogénase
responsable de la transformation du 2-3 butanediol en
acétyl-méthylcarbinol

1. Milieu de culture :

Protéose -peptone	0,5 g
K ₂ PO ₄ H	0,5 g
H ₂ O (distillée)	100 ml

Ajouter 0,5 % de méso 2-3 butanediol

Ajuster à pH 6

Stériliser par filtration

Distribuer 2 ml en tubes stériles de 160 x 16 mm

2. Culture :

Ensemencer 1 ÷se de culture de 24 heures en bouillon peptoné.

Incuber 24 à 48 heures à 30°C

Mettre en évidence la production acétylméthyl carbinol en utilisant la réaction d'O'MEARA.

A₆Préparation du lait pour culture des souches

Lait écrémé en poudre (Difco)	120 g
H ₂ O (distillée stérile)	1 000 ml

Stérilisation en vapeur fluente pendant 30 minutes.

A₇Milieu gélosé au caséinate de chaux

Pour 1 litre de milieu : 30 g de caséine Hammarsten

- 1°/ Mettre la caséine dans un mortier de porcelaine et faire une pâte avec de l'eau distillée. Verser ensuite de l'eau de chaux saturée et filtrée, à l'aide d'une burette. Surveiller l'acidité du mélange par des prises d'échantillon assez fréquentes. Amener à pH 7 en travaillant à la goutte, en testant avec une solution de bromothymol.
- 2°/ Mettre le caséinate 12 heures au frigo pour continuer la neutralisation de la caséine.
- 3°/ Reprendre le caséinate, réajuster à pH 7 si besoin est. Compléter à 1 000 ml avec de l'eau distillée.
- 4°/ Répartir en tubes de 160 x 16 mm 7,5 ml de caséinate. Stériliser à 120°C - 20 minutes.
- 5°/ Au moment de l'emploi, ajouter dans le tube de 7,5 ml de caséinate 7,5 ml de gélose à 30 0/00 fondue, mélanger, et couler en boîte de Pétri.

A_8

Milieu gélosé au lait

A 7,5 ml de lait (cf. A_6) ajouter 7,5 ml de gélose à 30 0/00
préalablement fondue, et couler en boîte de Pétri.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABD-EL-MALEK (Y.), GIBSON (T.), 1952. - Studies in the bacteriology of milk. IV - The gram-negative rods of milk. J. Dairy Res., 19, 294-301.
2. ABRAMS (E.), ZIERDT (C. H.), BROWN (J. A.), 1971. - Observations on Aeromonas hydrophila septicæmia in a patient with leuckæmia. J. Clin. Pathol., 24, 6, 491-492.
3. ALDOVA (E.), RAKOVSKY (J.), CHOVANCOVA (A.), 1966. - The microbiological diagnosis of strains of Aeromonas shigelloides isolated in Cuba. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol., Czechosl., 10, 4, 470-482.
4. ANDREYENKO (L. M.), KAMALYAN (L. A.), 1961. - The properties of Bethesda ballerup and methods of differentiation from Salmonella. J. Microbiol. Epidemiol. and Immunobiol., London, 32, 2061-2064.
5. AOKI (T.), EGUSA (S.), 1971. - Drug sensitivity of Aeromonas liquefaciens isolated from freshwater fishes. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., Jap., 37, 3, 176-185.
6. AOKI (T.), EGUSA (S.), OGATA (Y.), WATANABE (T.), 1971. - Detection of resistance factors in fish pathogene Aeromonas liquefaciens. J. Gen. Microbiol., 65, 3, 343-349.
7. ARIMA (K.), IWASAKI (S.), TAMURA (G.), 1967. - Milk clotting enzyme from microorganisms. Agr. Biol. Chem., 31, 5, 540-551.
8. ASAI (T.), OKOMURA (S.), 1956. - On a genus Kluyvera. Proc. imp. Acad. Japan, 32, 488-493.
9. BAER (H.), WASHINGTON (L.), 1972. - Numerical diagnostic key for the identification of Enterobacteriaceae. Appl. Microbiol., 23, 1, 108-112.

10. BAHADUR (K.), RANGANAYAKI (S.), 1960. - A study of the influence of certain poisons and of compounds which hinder the various enzymic processes taking during normal microbial dissimilations of carbohydrate, in the formation of acetoin and 2-3 butanediol by Aeromonas hydrophila.
Zbl. Bakt., II, Abt., 113, 465-469.
11. BAKKER (G.), SCHEFFERS (W.A.), WIKEN (T.O.), 1968. - A new method for the determination of clotting times in milk.
Neth. Milk Dairy J., 22, 1-2, 16-21.
12. BANG (P.), 1962. - The estimation of numbers of coli-bacteria in foods by means of a deep agar tube technique with a modified violet red bile agar.
Acta Vet. Scand., 3, 295-316.
13. BARTH (H.), 1965. - Bacteria of the coli-aerogenes group in the bacteriological examination of milk.
Arch. Hyg. Bakt., 2, 158-167.
14. BASILLE (D.), THIEULIN (G.), 1960. - Etude comparative de la recherche des bactéries indologènes et de l'épreuve du dénombrement des bactéries coliformes en gélose au désoxycholate pour le contrôle bactériologique du lait pasteurisé.
Le Lait, 40, 369-381.
15. BEERENS (H.), GUILLAUME (J.), 1952-53. - Mise en évidence de l'acétoïne produit par les bactéries : essai d'un milieu de recherche rapide.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 5, 133-138.
16. BEHNKE (U. Von), 1967. - Studies on the action of rennets of different origin. I Milk coagulation and casein degradation.
Milchwissenschaft, 22, 563-569.
17. BOARD (R.G.), 1965. - Bacterial growth on and penetration of the shell membrane of the hen's egg.
J. Appl. Bact., 28, 197-205.
18. BOARD (R.G.), 1965. - The properties and classification of the predominant bacteria in rotten eggs.
J. Appl. Bact., 28, 437-453.

19. BONEV (S.), ZAKHARIEV (Z.), 1972. - Mise en évidence de quelques Vibrio, Aeromonas et Plesiomonas dans les moules de la mer Noire.
Epidem. Mikrobiol. Infekc. Balesti. Balg., 9, 1, 97-99.
20. BOTTONE (E.), ALLERHAND (J.), 1970. - Aeromonas and Serratia : comparative study of extracellular deoxyribonuclease production and other biochemical characteristics.
Amer. J. Clin. Path., 53, 3, 378-382.
21. BRANDL (E.), 1968. - Die Mikroflora der Rohmilch und ihre Beeinflussung durch die Pasteurisierung der Milch.
Die Molkerei-Zeitung, 33, 1109-1114.
22. BREED (R. S.), MURRAY (E. D. G.), SMITH (N. R.), 1957. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
7th ed. London : Baillière, Tindall and Co., 1094 p.
23. BRISOU (J.), 1957. - Contribution à l'étude de la systématique des Pseudomonaceae.
Ann. Inst. Pasteur, 93, 397.
24. BRISOU (J.), MAGROU (E.), 1947. - Les variétés de coliformes dans leurs rapports avec l'hygiène des aliments.
Ann. Inst. Pasteur, 73, 3, 290.
25. BROCKELMANN (Von I.), 1966. - Le nombretotal de germes et de bactéries psychrophiles dans le lait stocké au froid.
Milchwissenschaft, 21, 275-278.
26. BROWN (A. D.), WEIDEMANN (J. F.), 1958. - The Taxonomy of the psychrophilic meat spoilage Bacteria : a reassessment.
J. Appl. Bact., 21, 1, 11-17.
27. BULGER (R. J.), SHERRIES (J. C.), 1966. - The clinical significance of Aeromonas hydrophila.
Arch. Int. Med., 118, 562-564.
28. BULLOCK (G. L.), 1966. - The identification and separation of Aeromonas liquefaciens from Pseudomonas fluorescens and related organisms in diseased fishes.
Appl. Microbiol., 9, 587-590.
29. BULLOCK (G. L.), SNIESKO (S.), DUNBAR (C.), 1965. - Characteristics and identification of oxidative Pseudomonads isolated from diseased fish.
J. Gene. Microbiol., 38, 1-7.

30. BUSSE (M.), 1968. - Der Enterobakterien. Nachweis bei der Überwachung von Trinkmilch.
Milchwissenschaft, 23, 414-418.
31. BUTTIAUX (R.), 1951. - L'analyse bactériologique des eaux de consommation.
Edit. Flammarion, Paris, 209 p.
32. BUTTIAUX (R.), 1952. - Distinction rapide entre Salmonella et bacilles Paracoli du groupe Ballerup-Bethesda.
Ann. Inst. Pasteur, 83, 156-166.
33. BUTTIAUX (R.), 1959. - The value of the association Escherichiae Group D. Streptococci in the diagnosis of contamination in foods.
J. Appl. Bact., 22, 153-158.
34. BUTTIAUX (R.), 1961. - Pseudomonas non pigmentés et Achromobacter.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 12, 43-58.
35. BUTTIAUX (R.), ALIZAMAN (M.), CATSARAS (M.), 1962. - Les Enterobacter dans les matières fécales humaines et animales.
Ann. Inst. Pasteur, 103, 97-100.
36. BUTTIAUX (R.), BEERENS (H.), TACQUET (A.), 1969. - Manuel de techniques bactériologiques.
Edit. Flammarion, Paris, 707 p.
37. BUTTIAUX (R.), FRENOY (R.), MORIAMEZ (J.), 1953-54. - Les caractères biochimiques du genre Providencia.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 6, 62-79.
38. BUTTIAUX (R.), GAGNON (P.), 1958-59. - Au sujet de la classification des Pseudomonas et des Achromobacter.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 10, 121-150.
39. BUTTIAUX (R.), KESTELOOT (A.), 1948. - Les Enterobactéries dénommées "Bacilles Para-Coli" ou "Paracolobactrum".
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1, 103-140.
40. BUTTIAUX (R.), KESTELOOT (A.), 1950. - Sur l'examen bactériologique des laits pasteurisés certifiés.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 3, 35-64.

41. BUTTIAUX (R.), MORIAMEZ (J.), PAPAVASSILIOU (J.), 1956. - Méthode simplifiée d'identification des Enterobacteriaceae n'attaquant pas rapidement le lactose.
Ann. Inst. Pasteur, 90, 113-143.
42. BUTTIAUX (R.), SAMAILLE (J.), PIERENS (Y.), 1956. - L'identification des Escherichieae des eaux. Test d'Eijkman et production d'indole à 44° C. Tests IMVIC-Uréase.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 8, 137-149.
43. CARLQUIST (P. R.), 1956. - A biochemical test for separating paracolon groups.
J. Bact., 71, 339-341.
44. CASELITZ (F. H.), BUCK (A. A.), 1958. - Biologische Studien an Mikroorganismen des Genus Aeromonas.
Zbl. Bakt., I. Abt. orig., 173, 407-416.
45. CASELITZ (F. H.), GÜNTHER (R.), 1960. - Weitere Beiträge zum Genus Aeromonas.
Zbl. Bakt., I. Abt. orig., 178, 15-24.
46. CASELITZ (F. H.), KREBS (D.), 1963. - Über die Tierpathogenität von Aeromonasstämmen.
Zbl. Bakt., I. Abt. orig., 187, 65-74.
47. CASELITZ (F. H.), MAASS (W.), 1962. - Aeromonasstämmen als Krankheitserreger, ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden.
Deuts. Med. Wochschr., 87, 198-200.
48. CATSARAS (M.), ANTONIEWSKI (J.), BUTTIAUX (R.), 1965. - Sur la production de colonies à centre orangé par Proteus rettgeri et Providencia sur la gélose au désoxycholate-citrate-lactose.
Ann. Inst. Past. Lille, 16, 99-101.
49. CATSARAS (M.), BUTTIAUX (R.), 1965. - Les Aeromonas dans les matières fécales humaines.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 16, 85-88.
50. CATSARAS (M.), BUTTIAUX (R.), 1965. - Au sujet de quelques réactions biochimiques pour l'identification des Enterobacteriaceae.
Ann. Inst. Pasteur, 16, 111-115.

51. CHAKRABARTY (A.N.), ADHYA (S.) and Coll., 1970. - The hydrolysis of Tween 80 by *Vibrios* and *Aeromonades*.
J. Appl. Bact., 33, 2, 397-402.
52. CHATTERJEE (B.D.), NEOGY (K.N.), 1972. - Studies on *Aeromonas* and *Plesiomonas* species isolated from cases of choleraic diarrhoea.
Indian J. Med. Res., 60, 4, 520-524.
53. CHEKMAREVA (N.F.), 1967. - Biological properties of Bacterial Flora isolated from milk, milk produce and washings from the ware and hands.
Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol., 3, 56-58.
54. CIBLIS (E.), 1965. - Einflub verschiedener Faktoren auf die bakteriologische Beschaffenheit und Haltbarkeit von pasteurisierter Milch.
Milchwissenschaft, 20, 123-132.
55. CIBLIS (E.), SCHWARZ (G.), 1960. - Vergleichende Untersuchungen über die Bestimmung von Bakterien der Coli- Aerogenes- Gruppe auf verschiedenen Nährböden.
Kieler Milchwirtschaft. Forsch. Berichte, 12, 109-117.
56. CLEGG (L.), 1957. - Les bactéries du lait cru.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 9, 113-127.
57. CLEMENT (M.T.), GIBBONS (N.E.), 1960. - *Aeromonas hydrophila* (*Pseudomonas hydrophila*) NRC 491 and NRC 492 established as *Aerobacter cloacae*.
Canad. J. Microbiol., 6, 591-593.
58. COLWELL (R.R.), LISTON (J.), 1961. - Taxonomic relationships among the *Pseudomonads*.
J. Bact., 82, 1-14.
59. COMINAZZINI (C.), 1961. - Genus *Aeromonas* di Kluyver-van-Niel(1936)
Boll. Ist. sieroten, Milan, 40, 532-561.
60. CONN (H.J.), 1922. - A method of detecting rennet production by *Bacteria*.
J. Bact., 7, 447-448.
61. CONN (H.W.), ESTEN (W.M.), STOCKING (W.A.), 1906. - A classification of dairy bacteria.
Rep. Storrs agric. Exp. Sta., 186.

62. COOK (K. A.), 1958. - A polarly flagellated member of the Enterobacteriaceae.
J. Appl. Bact., 21, 1-3.
63. CRAWFORD (J. P.), 1954. - A new fermentative Pseudomonad "Pseudomonas formicans".
J. Bact., 68, 734-738.
64. CRAWFORD (J. P.), SIKES (S.), MELHORN (D. K.), 1967. - The natural relationship of Aeromonas formicans.
Arch. Mikrobiol., Dtsch., 59, 72, 81-82.
65. CREMONINI (G.), SECCHI (C.), 1960. - Comportamento di alcuni terreni colturali solidi e liquidi nella colimetria del latte.
Latte, 34, 269-271.
66. CRUZ-CAMARILLO (R.), GARCIA DE CRUZ (Ma. del C.), 1968. - Isolation and purification of an extracellular protease of Serratia marcescens.
Rev. lat-amer. Microbiol. Parasitol., 10, 115-126.
67. DAHLE (H. K.), 1969. - Quantitative assay of a single proteolytic enzyme in a crude mixture of bacterial proteinases.
Acta path. microbiol. Scand., 77, 1, 134-142.
68. DAHLE (H. K.), 1969. - Enzymoserological separation of bacterial proteinases.
Acta path. microbiol. Scand., 77, 1, 143-148.
69. DAHLE (H. K.), 1971. - The purification and some properties of two Aeromonas proteinases.
Acta path. microbiol. Scand., 79, 6, 726-738.
70. DAHLE (H. K.), 1971. - Regulation of the proteinase production in two strains of Aeromonas.
Acta path. microbiol. Scand., 79, 6, 739-746.
71. DAHLE (H. K.), NORDSTOKA (K.), 1968. - Identification of Aeromonas in furred animals.
Acta vet. Scand., 9, 65-70.
72. DAMM (H.), 1957. - Zur Kontrolle der Milcherhitzung in Molkereien durch regelmässige Stufen-Coli-Controlle insbesondere am Auslauf des Milcherhitzungsapparates.
Hanover Inang. Diss., 90 p.

73. DANNO (G. I.), YOSHIMURA (S.), 1967. - Studies on alkaline proteinase of Aspergillus sydowi. I. Purification and some properties of the proteinase. II. Effect of calcium ion on stability and some modes of proteolysis.
Agr. Biol. Chem., 31, 10, 1151-1165.
74. DEMPSTER (J. F.), 1968. - Distribution of psychrophilic microorganisms in different dairy environments.
J. Appl. Bact., 31, 290-301.
75. DESHAZO (M. D.), 1969. - The proteolytic enzymes of Aeromonas proteolytica.
Diss. Abstr. B, 29, 12, 4508-4509.
76. DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.), 1968. - Facteurs intervenant dans la production du système protéolytique chez Micrococcus caseolyticus.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 8, 3, 419-429.
77. DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.), 1968. - Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de Micrococcus caseolyticus.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 8, 4, 565-577.
78. DIAS (F. F.), AGATE (A. D.), BHAT (J. V.), PILLAI (S. C.), 1968. - Aeromonas punctata in Puntius species.
Current Sci., India, 34, 3, 81-82.
79. DIKOVSKIJ (F. F.), 1966. - Sur l'importance sanitaire des bactéries du genre Proteus.
Lab. Delo, 109-111.
80. DIVE (D.), DUEE (J. P.), LECLERC (H.), 1971. - A propos d'une épizootie survenue chez les poissons d'eau douce. Etude bactériologique.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 22, 75-84.
81. DRION (E.), MOSSEL (D.), 1972. - Mathematical ecological aspects of the examination for Enterobacteriaceae of food processed for safety.
J. Appl. Bact., 35, 2, 233-239.
82. DRUCE (R. G.), THOMAS (S. B.), 1970. - An ecological study of the psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay.
J. Appl. Bact., 33, 2, 420.
- 82'. DRUCE (R. G.), THOMAS (S. B.), 1972. - Bacteriological studies on bulk milk collection : pipeline milking plants and bulk milk tanks as sources of bacterial contamination of milk. A review.
J. Appl. Bact., 35, 2, 253-269.

83. DYACHENKO (P. F.), SLAVYANOVA (V. V.), 1962. - Studies of rennet activity of proteolytic enzyme preparations.
Intern. Dairy Congr. Proc. 16th Copenhagen, B : 349-352,
F.I.L. Bruxelles.
84. EDDY (B. P.), 1960. - The use and meaning of the term "psychrophilic"
J. Appl. Bact., 23, 189-190.
85. EDDY (B. P.), 1960. - Cephalotrichus, fermentative Gram-negative bacteria : the genus Aeromonas.
J. Appl. Bact., 23, 216-249.
86. EDDY (B. P.), 1961. - The Voges-Proskauer reaction and its significance : a review.
J. Appl. Bact., 24, 27-41.
87. EDDY (B. P.), 1962. - Further studies on Aeromonas. I : additional strains and supplementary biochemical tests.
J. Appl. Bact., 25, 137-146.
88. EDDY (B. P.), CARPENTER (K. P.), 1964. - Further studies on Aeromonas. II : Taxonomy of Aeromonas and C27 strains.
J. Appl. Bact., 27, 96-109.
89. EDELSTEN (D.), HAMDY (A.), EL KOUSY (L.), 1969. - A study of microbial milk coagulating enzymes.
Kgl. Vet. Land-Bohøysk. Arsskr., 201-212.
90. EDWARDS (P. R.), EWING (W. H.), 1962. - Identification of Enterobacteriaceae.
Burgess Publishing Co., Minneapolis, 15, Minnesota, 258 p.
91. EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.), 1955. - Studies on the Klebsiella - Aerobacter group of Bacteria.
J. Bact., 70, 382, 390.
92. EGUSA (S.), 1968. - Changes of epizooties in pond eels in Japon.
Off. intern. Epizooties, Bull., Fr., 69, 7-8, 1035-1044.
93. ENTEROBACTERIACEAE SUB-COMMITEE, 1958. -
Report. Intern. Bull. Bacteriol. Nomenclature and Taxonomy,
8, 25-70.
94. ESCHMANN (H.), 1962. - Simple control of foods for Salmonellae, Shigella, Proteus and coliform bacteria.
Mitt. Lebensm. Hyg., Bern, 53, 2, 149-153.

95. ESSELMAN (M. T.), LIU (P. V.), 1961. - Lecithinase production by Gram-negative bacteria.
J. Bact., 81, 939-945.
96. ESTEVES (F. A.), 1962. - Thermoduric strains of "Escherichia aerobacter" in raw milk.
Int. Dairy Congr., C, 383-391.
97. EWING (W. H.), 1960. - Enterobacteriaceae, biochemical methods for group differentiation.
Public Health Service Publication, n° 734, U. S. Gort. Printing Office, Washington.
- 97!. EWING (W. H.), 1963. - An outline of nomenclature for the family ENTEROBACTERIACEAE.
Int. Bull. of Bact. Nom. and Tax., 13, 95-110.
98. EWING (W. H.), DAVIS (B. R.), EDWARDS (P. R.), 1960. - The decarboxylase reactions of Enterobacteriaceae and their value in taxonomy.
Public Health Lab., 18, 77-83.
99. EWING (W. H.), DAVIS (B. R.), REAVIS (R. W.), 1957. - Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology.
Publ. Health Lab., 15, 153-167.
100. EWING (W. H.), JOHNSON (J. G.). - 1960. - The differentiations of Aeromonas and C27 cultures from Enterobacteriaceae.
Inst. Bull. Bact. Nomencl. Tax., 10, 223-230.
101. FARAONE (P.), 1967. - Microbiological investigation of pasteurized milk. Coliform counts in 2 sections of a pasteurization plant.
Mondo Latte, 31, 1, 24-30.
102. FARREL (I.), JAYSON (G. G.), MAC CONLOUGH (L. C.), PIRIE (D. G.), 1967. - A rapid routine test for coliform contamination in food.
J. Sci. Food Agric., G. B., 18, 4, 138-143.
103. FAY (N. G.), BARRY (A. L.), 1972. - Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of Enterobacteriaceae.
Appl. Microbiol., 23, 4, 710-713.
104. FERGUSON (W. W.), HOOK (A. E.), 1943. - Urease activity of Proteus and Salmonella organism.
J. Lab. Clin. Med., 28, 1715-1719.
105. FISHBEIN (M.), SURKIEWICZ (B. F.), BROWN (E. F.), OXLEY (H. M.), PADRON (A. P.), GROOMES (R. J.), 1967. - Coliform behaviour in frozen foods. I : Rapid test for the recovery of E. coli from frozen foods.
Appl. Microbiol., 15, 2, 233-238.

106. FOLIN (O.), CIOCALTEU (V.), 1927. - On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.
J. Biol. Chem., 73, 2, 627-650.
107. FORSTER (H.), GASSER (H.), 1962. - Observations on the determination of count of coliforms and Salmonellae.
Mitt. Lebensm. Hyg., Bern, 53, 3, 230-234.
108. FOUAD (M. T. A.), RICHARDS (T.), 1953. - The use of glucose inorganic salts media in the classification of the coli Aerogenes Bacteria. I : The methyldred and Voges-Proskauer reactions.
Proc. Soc. appl. Bact., 16, 35-44.
109. FOX (P. F.), 1969. - Milk clotting and proteolytic activities of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin.
J. Dairy Res., 36, 427-433.
110. FOX (P. F.), 1969. - Influence of temperature and pH on the proteolytic activity of rennet extract.
J. Dairy Sci., 52, 1214-1218.
111. FURUKAWA (Y.), FUJII (Y.), TAKAHASHI (H.), 1968. - Some properties of three proteolytic enzymes excreted by Bacillus cereus Kp 931.
Agr. Biol. Chem., 32, 7, 822-829.
112. GEIZER (K.), KOPECKY (K.), ALDOVA (E.), 1966. - Isolation of Aeromonas shigelloides in child.
J. Hyg. Epidemiol., 10, 190-194.
113. GEIZER (K.), RYC (M.), ALDOVA (E.), 1968. - A contribution to the morphology of Aeromonas shigelloides.
Zbl. Bakteriolog. Parasitenkde. Infekt.-Krankh. Hyg., 1, Dtsch., 207, 1, 41-47.
114. GENIN (G.), 1968. - Les succédanés de la présure.
Le Lait, 48, 471-472, 53-59.
115. GILARDI (G. L.), 1967. - Morphological and biochemical characteristics of Aeromonas punctata (hydrophila, liquefaciens) isolated from human sources.
Appl. Microbiol., 15, 2, 417-421.
116. GILARDI (G. L.), BOTTONE (C. D.), BIRNBAUM (M.), 1970. - Unusual fermentative Gram-negative Bacilli isolated from clinical specimens. II Characterization of Aeromonas species.
Appl. Microbiol., 20, 1, 156-159.

117. GILBO (G.M.), BETON (C.D.), COLES (N.W.), 1967. - Electron microscopy of the lysis of Sta. aureus cell walls by Aeromonas lytic factor.
J. Bacteriol., 93, 6, 1972-1975.
118. GIRBAL (E.), 1965. - Enquête sur la qualité bactériologique et chimique des laits pasteurisés livrés à la consommation dans la commune de Marseille depuis avril 1963.
Bull. Acad. Nat. Med. (Paris), 149, 268-276.
119. GORDON (J.), MAC LEOD (J.W.), 1928. - The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology.
J. Path. Bact., 31, 185-190.
120. GORYAINOVA-IKOL (Z.P.), 1961. - Variability of pathogenic serotypes of E. coli in dairy products.
Pediatrics, 40, 5, 51-53.
121. GRABDA (E.), GRABDA (J.), 1968. - La maladie enzootique de la truite Salmo trutta dans la Vistule.
Off. Intern. Epizooties, Bull., Fr., 69, 9-10, 1507-1515.
122. GRABOVSKA (K.B.), 1966. - Study on flagellation in Aeromonas punctata.
Mikrobiologija, S. S. S. R., 35, 3, 448-490.
123. GRAEVENITZ (A. Von), MENSCH (A.H.), 1968. - The genus Aeromonas in human bacteriology. Report of 30 cases and review of the literature.
New Engl. J. Med., 278, 3, 245-249.
124. GRAEVENITZ (A. Von), ZINTERHOFER (L.), 1970. - The detection of Aeromonas hydrophila in stool specimens.
Health Lab. Sci., U.S.A., 7, 3, 124-127.
125. GRAY (J.D.A.), 1932. - The significance of Bact. aerogenes in water.
J. Hyg., 32, 132-142.
126. GREENE (V.W.), JEZESKI (J.J.), 1954. - The influence of temperature on the development of several psychrophilic bacteria of dairy origin.
Appl. Microbiol., 2, 110-117.

127. GRIFFIN (T.B.), 1966. - Production, isolation and physical characterization of Aeromonas proteolytica endopeptidase. Dissert. Bioch. and Nutrition, Texas A and M University, 82 p.
128. GRIFFIN (T.B.), PRESCOTT (J.M.), 1970. - Some physical characteristics of a proteinase from Aeromonas proteolytica. J. Biol. Chem., 245, 6, 1348-1356.
129. GRIFFIN (P.J.), SNIESZKO (S.F.), FRIDDLE (S.B.), 1952. - A more comprehensive description of Bacterium salmonicida. Trans. Amer. Fish. Soc., 82, 129-138.
130. GRIFFIN (P.J.), SNIESZKO (S.F.), FRIDDLE (S.B.), 1953. - Pigment formation by Bacterium salmonicida. J. Bact., 65, 652-659.
131. GRIMBERG (M.), 1965. - Neuartige Labfermente. Fette Seifen Anstrichmittel, 4, 271-273.
132. GROSS (R.), COLES (N.W.), 1969. - A Proteinase produced by Aeromonas hydrophila. Aust. J. Sci., 31, 9, 330-331.
133. GUINEE (P.A.M.), MOSSEL (D.A.A.), 1963. - The reliability of the test of Mc Kenzie, Taylor and Gilbert for the detection of faecal Escherichia coli strains of animal origin in foods. Leeuwenhoek ned. Tijdschr., 29, 163-168.
134. GUITTONEAU (G.), 1937. - Le problème actuel de la pasteurisation obligatoire des laits de consommation. Bull. Centre Econ. de l'alimentation, 11, 80-112.
135. GUITTONEAU (G.), MOCQUOT (G.), EYRARD (A.), 1938. - Recherches sur la pasteurisation des laits de consommation. I : Choix d'un milieu de culture pour la numération des germes microbiens. Le Lait, 18, 225-233.
136. GUITTONNEAU (G.), MOCQUOT (G.), EYRARD (A.), 1939. - Recherches sur la pasteurisation des laits de consommation. II : Sur la colimétrie appliquée aux contrôles de la pasteurisation des laits pasteurisés. Le Lait, 19, 113-139.

137. GUTHRIE (R.), HITCHNER (E. R.), 1943. - Studies of micro-organisms classified as Proteus hydrophilus Bergey. J. Bact., 45, 52.
138. GYLLENBERG (H. G.), 1965. - Character correlations in certain taxonomic and ecologic groups of bacteria. A study based on factor analysis. Ann. Med. Exp. Ferm., 43, 82-90.
139. GYLLENBERG (H. G.), EKLUND (E.). - 1966. - A taxonomic survey of the psychrophilic bacteria in milk and milk products. Milchwissenschaft, 21, 261-265.
140. GYLLENBERG (H. G.), EKLUND (E.), ANTILA (M.), VARTIOVAARA (U.), 1960. - Contamination and deterioration of market milk. Representatives of the genus Alcaligenes in milk. Acta Agric. Scand., 10, 168-176.
141. GYLLENBERG (H. G.), EKLUND (E.), ANTILA (M.), VARTIOVAARA (U.), 1963. - Contamination and deterioration of market milk. Taxometric classification of Pseudomonads. Acta Agric. Scand., 13, 157-176.
142. HABS (H.), SCHUBERT (R. H. W.), 1962. - Über die biochemischen Merkmale und die taxonomische Stellung von Pseudomonas shigelloides (Bader). Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig., 186, 316-327.
143. HAINES (R. B.), 1938. - Observations on the bacterial flora of the hen's egg, with a description of new species of Proteus and Pseudomonas causing rot in eggs. J. Hyg., Camb., 38, 338.
144. HASHIMOTO (M.), HORIUCHI (S.), KOSUGI (J.), KOOHARA (W.), NAKANE (B.), UCHIKAWA (K.), 1971. - Morphological studies on fimbriae of Pseudomonas aeruginosa and Aeromonas hydrophila with special reference to their biological functions. Bull. Tokyo med. dent. Univ., Jap., 18, 2, 105-122.
145. HELM (E. B.), STILLE (W.), 1970. - Akute enteritis durch Aeromonas hydrophila. Dtsch. med. Wsch., 95, 18-24.

146. HENDRIE (M. S.), SHEWAN (J. M.), 1971. - Aeromonas shigelloides (Bader) Ewing and al. a proposal that it be transferred to the genus Vibrio.
Intern. J. Syst. Bact., 21, 1, 25-27.
147. HERMAN (R. L.), 1968. - Fish furunculosis 1952-1966.
Trans. amer. Fish. Soc., 97, 3, 221-230.
148. HEUSCHMANN-BRUNNER (G.), 1970. - Die Aeromonaden in der Hydrobiologie.
Z. Wass. Abwass. Forsch., Dtsch., 3, 40-41.
149. HEYWOOD (R.), 1968. - Aeromonas infection in snakes.
Cornell Vet., 58, 236-241.
150. HIBBS (C. M.), MERKER (J. W.), KRUCKENBERG (S. M.), 1971. - Experimental Aeromonas hydrophila infection in rabbits.
Cornell. Veterinarian, U.S.A., 61, 3, 380-386.
151. HILL (K. R.), CASTELIZ (F. H.), MODDY (L. M.), 1954. - A case of acute, metastatic myositis caused by a new organism of the family Pseudomonaceae.
W. Indian. med. J., 3, 9-11.
152. HODGKISS (W.), 1960. - The interpretation of Flagella stains.
J. Appl. Bact., 23, 398-399.
153. HOGAN (M. A.), COLWELL (R. R.), 1969. - DNA base composition and esterase patterns of bacteria isolated from deep sea sediments.
J. Appl. Bact., 32, 1, 103-111.
154. HORB (B.), 1970. - Contribution à l'étude des Plectridium producteurs d'indole dans les laits pasteurisés conditionnés.
Thèse n° 30. Faculté de Pharmacie Université de Strasbourg.
155. HORMAECHE (E.), EDWARDS (P. R.), 1958. - Observations on the genus Aerobacter with a description of two species.
Int. Bull. Bact. Nom. Taxon., 10, 71-74.
156. HORMAECHE (E.), EDWARDS (P. R.), 1960. - A proposed genus Enterobacter.
Int. Bull. Bact. Nom. Taxon., 10, 71-74.

157. HORMAECHE (E.), EDWARDS (P.R.), 1960. - Proposal for the rejection of the generic name Cloaca Castellani and Chalmers, and proposal of Enterobacter as a generic name with designation of type species and of its type culture.
Int. Bull. Bact. Nom. Taxon., 10, 75-76.
158. HORMAECHE (E.), MUNILLA (M.), 1957. - Biochemical tests for the differentiation of Klebsiella and Cloaca.
Int. Bull. Bact. Nom. Taxon., 7, 1-20.
159. HUGH (R.), LEIFSON (E.), 1953. - The taxonomic significance of fermentative versus oxidation metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria.
J. Bact., 66, 25-26.
160. ILANI (J.), NETZER (A.), 1967. - Milk clotting activity of proteolytic enzymes.
J. Dairy Sci., 52, 1, 43-46.
161. INGRAHAM (J.-L.), STOKES (J.L.), 1959. - Psychrophilic bacteria.
Bact. Rev., 23, 97-108.
162. IWASAKI (S.), YASUI (T.), TAMURA (G.), ARIMA (K.), 1967. - Milk clotting enzyme from microorganisms. III: The purification of the enzyme and its properties. IV : Immunological studies on the enzyme properties.
Agr. Biol. Chem., 31, 12, 1427-1433.
163. JANKOV (G.Y.), 1968. - Recherches sur la microflore intestinale des Carpes atteintes d'hydropisie infectieuse.
Off. Int. Epizooties, Bull., Fr., 69, 7-8, 1057-1072.
164. JANKOV (G.Y.), 1968. - Etudes sur les propriétés pathogènes de quelques souches d'Aeromonas et de Pseudomonas, et leur action sur les Carpes saines.
Off. Int. Epizooties, Bull., Fr., 69, 7-8, 1085-1098.
165. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANCAISE, 1970. - Contrôle des laits crus et des laits pasteurisés destinés à la consommation humaine.
Brochure n° 1037, J.O., 26, rue Desaix, Paris (15e).
166. JUFFS (H.S.), HAYWARD (A.C.), DOELLE (H.W.), 1968. - Growth and proteinase production in Pseudomonas spp. cultivated under various conditions of temperature and nutrition.
J. Dairy Res., 35, 3, 385-393.

167. KAUFFMANN (F.), EDWARDS (P. R.), EWING (W. H.), 1956. -
The principles of group differentiation within the Enterobacteriaceae by biochemical methods.
Int. Bull. Bact. Nom. Taxon., 6, 29-33.
168. KAY (H. D.) et Al., 1954. - La pasteurisation du lait.
222 p. (Publié conjointement par la F. A. O. et l'O. M. S.), Genève.
169. KEEN (N. T.), WILLIAMS (P. H.), 1967. - Effect of nutritional factors on extracellular protease production by Pseudomonas lachrymans.
Can. J. Microbiol., 13, 7, 863-871.
170. KEEN (N. T.), WILLIAMS (P. H.), WALKER (J. L.), 1967. - Characterization of a protease produced by Pseudomonas lachrymans.
Phytopathology, 57, 3, 257-262.
171. KELLERMANN (R.), 1959. - Über den Nachweis von Coli-Aerogenes-Bakterien in Molkereigebrauchswasser.
Milchwiss., 14, 487-488.
172. KIELWEIN (G.), 1969. - Ein Nährboden zur selektiven Zucht von Pseudomonaden und Aeromonaden.
Arch. Lebensmittelhyg., 20, 6, 131-133.
173. KIELWEIN (G.), 1971. - Pseudomonaden und Aeromonaden in Trinkmilch : ihr Nachweiss und ihre Bewertung.
Arch. Lebensmittelhyg., 22, 1, 15.
174. KIELWEIN (G.), 1972. - Classification des genres Pseudomonas et Aeromonas.
Arch. Lebensmittelhyg., 23, 12, 281-284.
175. KIELWEIN (G.), GERLACH (R.), JOHNE (H.), 1969. - Prevalence of Aeromonas hydrophila in raw milk.
Arch. Lebensmittelhyg., 20, 2, 34-38.
176. KIELWEIN (G.), JOHNE (H.), GERLACH (R.), 1969. - Biological characteristics of Pseudomonads and Aeromonads of importance in milk hygiene.
Arch. Lebensmittelhyg., 20, 3, 55-61.
177. KJEMS (E.), 1955. - Studies of five bacterial strains of the genus Pseudomonas.
Acta Path. Microbiol. Scand., 36, 531-536.

178. KLONTZ (G. W.), ANDERSON (D. P.), 1968. - Fluorescent antibody studies of isolates of Aeromonas salmonicida.
Bull. Off. Int. Epiz., 69, 7-8, 1149-1157.
179. KLUYVER (A. J.), NIEL (L. B. Van), 1936. - Prospects for a natural system of classification of Bacteria.
Zbl. f. Bakt. r Abt., 94, 369-403.
180. KNAUT (T.), 1967. - Propriétés protéolytiques des espèces de Pseudomonas en culture dans le lait.
Milchwiss., Dtsch., 22, 5, 289-292.
181. KOK (N.), 1967. - Aeromonas hydrophila, liquefaciens isolated from tonsillitis in man. Report of a case.
Acta Path. Microbiol. Scand., Danem., 71, 4, 599-602.
182. KONING (P. J.), ROOIJEN (P. J. Van), KOK (A.), 1969. - Characterization of mixtures of calf rennet and rennet substitutes.
Neth. Milk Dairy J., 23, 55-70.
183. KOTHARI (S. L.), SARASWAT (D. S.), 1968. - Comparative study of bacterial tests for assessing the quality of milk.
Milchwiss., 23, 8, 487-491.
184. KRIEG (R. E.), LOCKHART (W. R.), 1966. - Classification of Enterobacteria based on overall similarity.
J. Bacteriol., 92, 5, 1275-1280.
185. KULP (W. L.), BORDEN (D. G.), 1942. - Further studies on Proteus hydrophilus, and etiological agent in "red-leg" disease of frogs.
J. Bacteriol., 44, 673-685.
186. KUNDRAT (W.), 1966. - Psychrophile Bakterien in Milch und Milchprodukten.
Arch. f. Lebensmittelhyg., 7, 160-162.
187. LACROSSE (R.), 1966. - Caractères caséolytique et lipolytique des bactéries psychrophiles isolées dans les laits ou les crèmes conservés à basse température.
Milchwiss., 21, 278-279.
188. LAUTROP (H.), 1961. - Aeromonas hydrophila isolated from human faeces and its possible pathological significance.
Acta Path. Microbiol. Scand., 51, 299-301.

189. LECLERC (H.), 1961-1962. - Etude des bacilles Gram négatif présentant une activité β -galactosidasique, isolés des eaux. Thèse, Fac. Méd. Pharma. Lille, n° 272.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1963, 14, 49-110.
190. LECLERC (H.), 1962. - Etude biochimique d'Enterobacteriaceae pigmentés.
Ann. Inst. Pasteur, 102, 726-741.
191. LECLERC (H.), 1962. - Diagnostic bactériologique des Aeromonas.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol., Nancy, 88, 12-20.
192. LECLERC (H.), BEERENS (H.), 1962. - Une technique simple de mise en évidence de l'oxydase chez les bactéries.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 13, 187-192.
193. LECLERC (H.), BUTTIAUX (R.), 1962. - Fréquence des Aeromonas dans les eaux d'alimentation.
Ann. Inst. Pasteur, 103, 1, 97-100.
194. LECLERC (H.), BUTTIAUX (R.), 1965. - Les Citrobacter.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 16, 67-74.
195. LECLERC (H.), OSTEUX (R.), 1965. - Dégradation des acides aminés chez Aeromonas.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 16, 75-84.
196. LECLERC (H.), OSTEUX (R.), 1966. - L'arginine décarboxylase chez Aeromonas shigelloïdes.
Ann. Inst. Pasteur, 110, 5, 737-754.
197. LEIFSON (E.), 1933. - The fermentation of sodium malonate as a means of differentiating Aerobacter and Escherichia.
J. Bact., 26, 329-330.
198. LEIFSON (E.), 1960. - Atlas of bacterial flagellation.
Academic Press, New York and London, 171 p.
199. LEIFSON (E.), HUGH (R.), 1953. - Variation in shape and arrangement of bacterial flagella.
J. Bact., 65, 263-271.
200. LE MINOR (L.), 1967. - Le diagnostic de laboratoire des Entérobactéries.
Collection "Techniques de base". Edit. de la Tourelle (3e éd.).

201. LE MINOR (L.), BEN HAMIDA (F.), 1962. - Avantage de la recherche de la β -galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des Enterobacteriaceae.
Ann. Inst. Pasteur, 102, 3, 267-277.
202. LE MINOR (L.), CHALON (A. M.), VERON (M.), 1972. - Recherches sur la présence de l'antigène commun des Enterobacteriaceae (antigène Kunin) chez les Yersinia, Levinea, Aeromonas et Vibrio.
Ann. Inst. Pasteur, 123, 6, 761-774.
203. LI (M. F.), JORDAN (C.), 1968. - A proteolytic Pseudomonad from skin lesions of rainbow trout (Salmo gairdnerii).
II : Some properties of the proteinase.
Canad. J. Microbiol., 14, 8, 875-880.
204. LISON (L.), - 1958. - Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse des résultats. Gauthier-Villars éd., Paris, 346 p.
205. LITCHFIELD (C. D.), PRESCOTT (J. M.), 1970. - Regulation of proteolytic enzyme production by Aeromonas proteolytica.
I. Extracellular endopeptidase. II. Extracellular aminopeptidase.
Canad. J. Microbiol., 16, 1, 17-27.
206. LIU (P. V.), 1962. - Fermentation reactions of Pseudomonas caviae and its serological relationship to Aeromonads.
J. Bact., 83, 750-753.
207. LOBOUNTZOV (K. A.), ROUDIKOV (N. I.), 1968. - Etude des propriétés de la tosine d'Aeromonas punctata.
Office intern. Epizooties, Bull. Fr., 69, 7-8, 1099-1105.
208. LOPEZ (J. F.), QUESADA (J.), SAIED (A.), 1968. - Bacteremia and osteomyelitis due to Aeromonas hydrophila. A complication during the treatment of acute leukemia.
Amer. J. Clin. Pathol., 50, 5, 587-591.
209. LOWE (G. H.), - 1962. - The rapid detection of lactose fermentation in Paracolon Organisms by the demonstration of β -D. Galactosidase.
J. Med. Lab. Techn., 19, 1, 21-25.

210. LUDVA (J.), 1972. - Evaluation de la contamination de médicaments par des germes des genres Mima et Aeromonas.
Ceskosl. Farm. Ceskosl., 21, 10, 463-466.
211. MACAULAY (D.M.), HAWIRKO (R.Z.), JAMES (N.), 1963. -
Effect of pasteurization on survival of certain psychrophilic bacteria.
Appl. Microbiol., 11, 90.
212. MAC DERMOTT (L.A.), 1968. - Aeromonas sp. infection in Great lakes lampreys.
J. Fish. Res. Board Canada, 25, 7, 1521-1522.
213. MAC DONALD (C.E.), CHEN (L.L.), 1965. - The Lowry modification of the Folin reagent for determination of proteinase activity.
Annal. Bio. Chem., 10, 175-177.
214. MAC FADDEN (T.W.), 1969. - Effective desinfections of trout eggs to prevent egg transmission of Aeromonas liquefaciens.
J. Fish. Res. Board Canada, 26, 9, 2311-2318.
215. MACKENSIE (E.W.), TAYLOR (E.W.), GILBERT (W.E.), 1948. - Recent experiences in the rapid identification of Bacterium coli type I.
J. Gen. Microbiol., 2, 197-207.
216. MALCOLM (J.F.), 1938. - The classification of coliform bacteria.
J. Hyg., 38, 395-423.
217. MALLIGO (J.E.), PARR (L.W.), ROBBINS (M.L.), 1955. - Escherichia aurescens (PARR) comb. nov. a pigmented species.
J. Bact., 70, 498-500.
218. MARTINEZ-SILVA (R.), GUZMANN-URREGO (M.), CASELITZ (F.M.), 1961. - Zur Frage der Bedeutung von Aeromonasstämmen bei Säuglingsenteritis.
Zschr. Tropenmed., 12, 445-451.
219. MATTHEIS (T.), 1964. - Vergleichende Untersuchungen an Aeromonas - und Paracolonobacterium - Stämmen.
Zbl. Bakt., II. Abt., 118, 117-133.
220. MATTHEIS (T.), 1967. - Die Bakterienflora des Karpfeus (Cyprinus carpio) und ihre Bedeutung für die Teichwirtschaft.
Ass. internat. Limnol. theor. appl., Trav., All., 16, 3, 1449-1453.

221. MAWDESLEY-THOMAS (L. E.), 1969. - Furunculosis in the goldfish Carassius auratus.
J. Fish. Biol., G. B., 1, 1, 19-23.
222. MAXCY (R. B.), 1967. - Nature and growth response of the microflora of pasteurized packaged milk.
J. Milk Food Technol., 30, 7, 213-218.
223. MAZURKIEWICZ (M.), WACHNIK (Z.), 1969. - Coli granulomatosis of geese complicated by Aeromonas hydrophila.
Med. Weteryn., 25, 274-276.
224. MEEKS (M. V.), 1963. - The genus Aeromonas : Methods for identification.
Ann. J. Med. Technol., 29, 361-378.
225. MELACHOURIS (N.), TUCKEY (S. L.), 1968. - Properties of a milk clotting microbial enzyme.
J. Dairy Sci., 51, 5, 650-655.
226. MERKEL (J. R.), TRAGANZA (E. D.), MUKHERJEE (B. B.), GRIFFIN (T. B.), PRESCOTT (J. M.), 1964. - Proteolytic activity and general characteristics of a marine bacterium Aeromonas proteolytica sp. N.
J. Bact., 87, 1227-1233.
227. MILES (A. A.), MILES (E. M.), 1951. - The identity of Proteus hydrophilus Bergey and al. and Proteus melanovogenes Miles and Halnan, and their relation to the genus Aeromonas Kluyver and Van Niel.
J. Gen. Microbiol., 5, 298-306.
228. MILHAUD (G.), 1958. - Contribution à l'étude de l'analyse bactériologique du lait (coliformes, indologènes).
Thèse Doct. Vét., Toulouse, n° 30.
229. MOCQUOT (G.), EYRARD (A.), 1937. - Sur la microflore envahissante des laits de consommation, son origine et sa signification dans les contrôles hygiéniques.
Bull. Acad. Méd., 118, 39, 754-759.
230. MOCQUOT (G.), AUCLAIR (J.), 1967. - Les bactéries psychrophiles dans le lait conservé à basse température.
Rev. Lait. Française, n° 239.

231. MOHIELDIN (S.), EL HEFNY (G.), SAYED -MAHMOUD (S.), ABDALLAH (A.), 1965. - Bacteriological and chemical studies on the Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Alcaligenes and Aeromonas in infantile diarrhoea. J. Trop. Ped., Ouganda, 11, 69-78.
1966. - Bacteriological and chemical studies in infantile diarrhoea. II. Doubtful pathogens : Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Alcaligenes and Aeromonas. J. Trop. Ped., Ouganda, 11, 4, 88-94.
232. MØLLER (V.), 1955. - Simplified tests for some amino-acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta pathol. microbiol. Scand., 36, 158-172.
233. MOSSEL (D.A.A.), 1957. - The presumptive enumeration of lactose negative as well as lactose positive Enterobacteriaceae in foods. Appl. Microbiol., 5, 379-381.
234. MOSSEL (D.A.A.), MARTIN (G.), 1961. - Milieu simplifié permettant l'étude des divers modes d'action des bactéries sur les hydrates de carbone. Ann. Inst. Pasteur Lille, 12, 225-226.
235. MOUCHET (F.), 1962. - Énumération des bactéries productrices d'indole et coliformes dans le lait pasteurisé. Ecole Nation. Vét. Lyon : Thèse 40.
236. MUNDT (J.O.), RAI (B.N.), 1963. - Rapid detection of faecal coliform bacteria in the food processing plant. J. Milk Food Techn., 26, 46-49.
237. NAUMANN (G.), GARTNER (L.), SCHADE (R.), 1969. - Aeromonas hydrophila als Eiterreger. Med. Welt. Dtsch., 31, 1711-1712.
238. NIKHINSON (I.M.), BASKOVICH (Ts.L.), GORODETSKAYA (V.M.), SHVETS (Ts.I.), 1962. - Study of the contamination of milk and dairy products with pathogenic coliform bacteria. Gigiena i Sanit., 27, 65-66.
239. NIKHINSON (I.M.), GORODETSKAYA (V.M.), CHERNOV (I.I.), EPSTEIN (S.M.), KURASOVA (ZH.V.), 1965. - The contamination of pasteurized milk with pathogenic strains of intestinal bacteria. Gigiena i Sanit., 30, 81.
240. NORME INTERNATIONALE POUR LE DENOMBREMENT DES BACTERIES COLIFORMES DANS LE LAIT PASTEURISE, 1966. - F.I.L. : 40. Fédération Internationale de Laiterie, 10, rue Ortélius, Bruxelles, Belgique.

241. NYGAARD (G. S.), BISSETT (M. L.), WOOD (R. M.), 1970. - Laboratory identification of Aeromonads from man and other animals.
Appl. Microbiol., 19, 4, 618-620.
242. OBERENDER (H.), 1971. - Die Bedeutung von Aeromonas hydrophila als Krankheitserreger des Menschen (Bericht über eine Wundinfektion mit Aeromonas hydrophila).
Z. Ges. Hyg. Grenzgeb., 17, 10, 740-742.
243. OJALA (O.), 1966. - Isolation of an anareogenic Bacterium resembling Aeromonas salmonida in spawning lake trouts.
Bull. off. Int. Epiz., 65, 793-804.
244. OJALA (O.), 1968. - Observations on the occurrence of Aeromonas hydrophila and Aeromonas punctata in fish.
Bull. off. int. Epiz., 69, 1107-1123.
245. OSMAN (H. G.), ABDEL-FATTAH (A. F.), ABDEL-SAMIE (M.), MABROUK (S. S.), 1969. - Production of a milk-clotting enzyme preparation by Aspergillus niger and the effect of various factors on its activity.
J. Gen. Microbiol., 59, 125-129.
246. OTTESEN (M.), 1967. - Induction of biological activity by limited proteolysis.
Amer. Rev. Biochem., 36, 55-76.
247. OVERCAST (W. W.), 1968. - Psychrophilic microorganisms and keeping quality of milk and its products.
J. Dairy Sc., 51, 1336-1338.
248. PAGE (L. A.), 1962. - Acetylmethylcarbinol production and the classification of Aeromonads associated with ulcerative diseases of ectothermic vertebrates.
J. Bact., 84, 772-777.
249. PANES (J. J.), THOMAS (S. B.), 1959. - The multiplication of coliaerogenes bacteria in milk stored at 3-5° C.
J. Appl. Bact., 22, 272-277.
250. PAPAVALASSILIOU (J.), 1958. - The rapid identification of E. coli by the production at 44° C of both indole and gas from lactose.
J. Appl. Bact., 21, 104-108.
251. PARK (R. W. A.), 1962. - A study of certain heterotrophic polarly flagellate water bacteria : Aeromonas, Pseudomonas and Comamonas.
J. Gen. Microbiol., 27, 121-133.

252. PARK (R. W. A.), HOLDING (A. J.), 1966. - Identification of some common Gram-negative bacteria.
Lab. Pract., G. B., 15, 10, 1124-1127.
253. PAUCKOVA (V.), FUKALOVA (A.), 1968. - Occurrence of Aeromonas hydrophila and Aeromonas shigelloides in feces.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 206, 212-216.
254. PEARSON (T. A.), MITCHELL (C. A.), HUGHES (W. T.), 1972. - Aeromonas hydrophila septicemia.
Amer. J. Dis. child., 123, 6, 579-582.
255. PIEN (J.), BACHIMONT (J.), 1932. - Sur la recherche du Bacterium coli dans le lait.
Le Lait, 12, 903-914; 1058-1071.
256. PIEN (J.), BACHIMONT (J.), FILHOL (R.), 1933. - Sur la recherche du Bacterium coli dans le lait.
Le Lait, 13, 346-362; 548-563; 819-843.
257. PIPPY (J. M. C.), HARE (G. M.), 1969. - Relationship of river pollution to bacterial infection in Salmon (Salmo salar) and Suckers (Catostomus commersoni).
Trans. amer. Fish. Soc., 98, 4, 685-690.
258. PIVNICK (H.), SABINA (L. R.), 1957. - Studies of Aeromonas formicans Crawford comb. nov. from soluble oil emulsions.
J. Bact., 73, 247-252.
259. POLLOCK (M. R.), 1962. - Exoenzymes.
In the Bacteria, IV, ed. by I. C. Gunsalus and R. Y. Stamer, Acad. Press, Inc., New York, 121-178.
260. PRAPROTNIK (V.), 1968. - Versuchserfahrungen mit mikrobiellem Lab.
Dtsch. Molk. Zeitung, 46, 2058-2060.
261. PRESCOTT (S. M.), WILKES (S. H.), 1966. - Aeromonas aminopeptidase. Purification and some general properties.
Arch. Biochem. Biophys., 117, 2, 328-336.
262. PREVOT (A. R.), 1961. - Traité de systématique bactérienne.
Paris, Dunod, 1, 471 p.; 2, 771 p.

263. PUHAN (Z.), 1966. - Production of a milk clotting enzyme from Bacillus subtilis.
XVIIIth Intern. Dairy Congr., Munich, Section D, 199-204.
264. PUHAN (Z.), IRVINE (M. D.), 1973. - Proteolysis by proteases of Bacillus subtilis used to make canadian Cheddar cheese.
J. Dairy Sci., 56, 3, 317-322.
265. PUHAN (Z.), IRVINE (M. D.), 1973. - Reduction of proteolytic activity of Bacillus subtilis proteases by acidification of milk before Cheddar cheese manufacture.
J. Dairy Sci., 56, 3, 323-327.
266. QUIGLEY (M. M.), COLWELL (R. R.), 1968. - Properties of bacteria isolated from deep. sea sediments.
J. Bacteriol., 95, 1, 211-220.
267. RACKOW (H. G.), 1961. - The coli test by means of liquid TTC containing media from the point of view of official milk control.
Milchwiss., 16, 565-572.
268. READ (R. B.), SCHWARTZ (C.), LITSKY (W.), 1961. - Studies on thermal destruction of Escherichia coli in milk and milk products.
Appl. Microbiol., 9, 415-418.
269. RENOUX (G.), TERDJMAN (A.), 1962. - Aerobacter aerogenes et Klebsiella pneumoniae
Ann. Inst. Pasteur, 82, 242-245.
270. REPORT (of the coli-Aerogenes- subcommittee of the Society for applied bacteriology), 1956. - The nomenclature of coli Aerogenes bacteria.
J. Appl. Bact., 19, 108-111.
271. RICHARD (C.), BRISOU (B.), LIOULT (J.), 1972. - Etude taxonomique de Levinea, nouveau genre de la famille des Enterobacteriaceae.
Ann. Inst. Pasteur, 122, 6, 1137-1146.
272. RIVA (A.), SCHIAVONE (E. L.), VADILLO (E.), 1965. - Control de la pasteurización de la leche (comparación de métodos).
Rev. As. bioquím. Argent., 30, 161, 254-262.

273. ROSNER (R.), 1964. - Aeromonas hydrophila as the etiologic agent in a case of severe gastro-enteritis.
Ann. J. Clin. Path., 42, 4, 402-404.
274. ROSS (A. J.), 1962. - Isolation of a pigment producing strain of Aeromonas liquefaciens from silver salmon.
J. Bact., 84, 590-591.
275. ROUF (M. A.), RIGNEY (M. M.), 1971. - Growth temperatures and temperature characteristics of Aeromonas.
Appl. Microbiol., 22, 4, 503-506.
276. ROUF (M. A.), WEBER (P. L.), RIGNEY (M. M.), 1971. - Amino-acid requirements of Aeromonas.
Appl. Microbiol., 21, 2, 371-373.
277. RYDEN (A. C.), HOFSTEN (B. V.), 1968. - Some properties of the extracellular proteinase and of the cell-bound peptidase of Serratia.
Acta Chem. Scand., 22, 2803-2808.
278. SAKAZAKI (R.), NAMIOKA (S.), NAKAYA (R.), FUKUMI (M.), 1959. - Studies on so-called paracolour C 27 (Ferguson).
Jap. J. Med. Sci. Biol., 12, 355-363.
279. SAMAGH (B.), CUNNINGHAM (J.), 1972. - Numerical taxonomy of the genus Pseudomonas from milk and milk products.
J. Dairy Sci., 55, 1, 19-24.
280. SANDVIK (O.), HAGEN (O.), 1968. - Serological studies on proteinases produced by Aeromonas salmonicida and other Aeromonads.
Acta Vet. Scand., 9, 1, 1-9.
281. SARDINAS (J. L.), 1969. - New sources of rennet.
Process. Biochem., 4, 7, 13-16.
282. SCHÄPERCLAUS (W.), 1965. - Etiology of infections carp dropsy.
Ann. New York Acad. Sci., 126, 587-597.
283. SCHERAGO (M.), 1936. - An epizootic septicemia of young guinea pigs caused by Pseudomonas caviae n. sp.
J. Bact., 31, 83.

284. SCHUBERT (R. H. W.), 1960. - Untersuchungen über die Merkmale der Gattung Aeromonas.
Zbl. Bakt., P. Abt. Orig., 180, 310-326.
285. SCHUBERT (R. H. W.), 1962. - Über die biochemischen Eigenschaften der anaerogenen Aeromonaden.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 185, 503-511.
286. SCHUBERT (R. H. W.), 1963. - Über die biochemischen Eigenschaften von Aeromonas hydrophila.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 188, 62-69.
287. SCHUBERT (R. H. W.), 1964. - Zur Taxonomie der anaerogenen Aeromonaden.
Zbl. Bakt. Paras. Infekt. Krankh. hyg., Dtsch., 193, 3, 343-352.
288. SCHUBERT (R. H. W.), 1964. - Zur Taxonomie des Voges-Proskauer negativen hydrophila ähnlichen Aeromonades.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 193, 482-490.
289. SCHUBERT (R. H. W.), 1967. - The taxonomy and nomenclature of the genus Aeromonas Kluver and Van Niel 1936. I. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the aerogenic Aeromonas species.
Intern. J. Syst. Bact., 17, 23-27.
290. SCHUBERT (R. H. W.), 1967. - The taxonomy and nomenclature of the genus Aeromonas Kluver and Van Niel 1936. II. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the anaerogenic Aeromonas species.
Intern. J. Syst. Bact., 17, 273-279.
291. SCHUBERT (R. H. W.), 1967. - Die Systematik der Aeromonaden.
Arch. Hyg., Berl., 150, 681-688.
292. SCHUBERT (R. H. W.), 1967. - Das Vorkommen der Aeromonaden in oberirdischen Gewässern.
Arch. Hyg. Bakt., 150, 688-708.
293. SCHUBERT (R. H. W.), 1967. - Die Pathogenität der Aeromonaden für Mensch und Tier.
Arch. Hyg. Bakt., Dtsch., 150, 709-716.

294. SCHUBERT (R. H. W.), 1967. - Experimentelle Untersuchungen über die für die Massenentwicklung der Aeromonaden im Abwasser wichtigen Faktoren.
Arch. Hyg. Bakt., Dtsch., 151, 409-436.
295. SCHUBERT (R. H. W.), 1968. - The taxonomy and nomenclature of the genus Aeromonas Kluyver and Van Niel 1936. III. Suggestions on the definition of the genus Aeromonas Kluyver and Van Niel 1936.
Intern. J. Syst. Bact., 18, 1-7.
296. SCHUBERT (R. H. W.), 1969. - Über den Aminosäureverwendungsstoffwechsel bei Angehörigen des Genus Aeromonas.
Zbl. Bakt., Abt. I, 211, 403-405.
297. SCHUBERT (R. H. W.), 1969. - Aeromonas hydrophila subsp. proteolytica (Merkel and al. 1964) comb. nov.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 211, 3, 409-412.
298. SCHUBERT (R. H. W.), 1969. - On the taxonomy of Aeromonas salmonicada subsp. achromogenes (Smith 1963) Schubert 1967 and Aeromonas salmonicada subsp. masoucida Kimura 1969.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 211, 3, 413-417.
299. SCHUBERT (R. H. W.), 1971. - Status of the name Aeromonas and Aerobacter liquefaciens Beijerinck and designation of a neotype strain for Aeromonas hydrophila Stanier.
Intern. J. Syst. Bact., 21, 1, 87-90.
300. SCHUBERT (R. H. W.), SCHÄFFER (E.), 1971. - Vergleichende Untersuchungen über die Eliminierung von Viren, Salmonellen und Aeromonaden im Vorfluter.
Gas-u. Wasserfach, Wasser Abwasser, 112, 8, 401-403.
301. SCHUBERT (R. H. W.), SCHÄFFER (E.), MEISER (W.), 1972. - Vergleichende Untersuchungen über die Eliminierung von Poliomyelitis Impfvirus und Aeromonaden an einer halbtechnischen Belebtschlammanlage des Groner Erverbandes in Bergheim.
Gas-u. Wasserfach, Wasser Abwasser, 113, 3, 132-134.
302. SCOTNICK (I. J.), 1971. - Aeromonas species isolate.
Ann. New York Acad. Sci., 174, 2, 503.

303. SCOTT (M.), 1968. - The pathogenicity of Aeromonas salmonicida (Griffin) in sea and brackish waters.
J. Gen. Microbiol., 50, 2, 321-327.
304. SEDLAK (J.), SLAJSOVA (M.), 1962. - On the taxonomy of the genus Aeromonas.
Public. Fac. Sci. Univ. J.E. Purkine, Brno, 28, 438, 508-510.
305. SHEWAN (J.M.), HOBBS (G.), HODGKISS (W.), 1960. - A determinative schema for the identification of certain genera of Gram-negative Bacteria, with special reference to the Pseudomonaceae.
J. Appl. Bact., 23, 379-390.
306. SHILKIN (K.B.), ANNEAR (D.I.), ROWETT (L.R.), 1968. - Infection due to Aeromonas hydrophila.
Med. J. Austr., 55, 2, 351.
307. SHIMIZU (T.), 1969. - Studies on pathogenic properties of Aeromonas liquefaciens. I. Production of toxic substance to eel.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35, 1, 55-63.
308. SHIMIZU (T.), 1969. - Studies on pathogenic properties of Aeromonas liquefaciens. II. Separation of toxic factors by gel filtration.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35, 2, 163-170.
309. SHIMIZU (T.), 1969. - Studies on pathogenic properties of Aeromonas liquefaciens. III. Some chemical and antigenic properties of toxic factors.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35, 5, 423-429.
310. SHIMIZU (T.), 1969. - Studies on pathogenic properties of Aeromonas liquefaciens. IV. Necrotic factor for eel and guinea pig.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35, 7, 613-618.
311. SHOTTS (E.B.), GAINES (J.L.), MARTIN (L.), PRESTWOOD (A.K.), 1972. - Mort provoquée par Aeromonas parmi les poissons et les reptiles dans un lac intérieur eutrophique.
J. Amer. Vet. Med. Ass., 161, 6, 603-607.
312. SHUGART (R.I.), BECK (P.), 1964. - Isolation and activity of protéinase of Streptococcus faecalis var. liquefaciens.
J. Bact., 88, 3, 586-590.

313. SIMIDU (U.), ASHINO (K.), KANEKO (E.), 1971. - Bacterial flora of phyto- and zoo-plankton in the inshore water of Japan.
Can. J. Microbiol., 17, 9, 1157-1160.
314. SIMIDU (U.), KANEKO (E.), AISO (K.), 1969. - Microflora of fresh and stored flatfish Kareius bicoloratus.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 35, 1, 77-82.
315. SMITH (I. W.), 1963. - The classification of Bacterium salmonicida.
J. Gen. Microbiol., 33, 263-274.
316. SOBECK-SKAL (E.), BINDER (W.), 1961. - Coliform flora in dairy plants.
Milchwiss. Berichte, 11, 225-233.
317. SOMKUTI (G. A.), BABEL (F. J.), 1967. - Conditions influencing the synthesis of acid protease by Mucor pusillus Lindt.
Appl. Microbiol., 15, 6, 1309-1312.
318. SOMKUTI (G. A.), BABEL (F. J.), 1969. - Hydrolytic breakdown of casein by a proteinase of Streptococcus var. liquefaciens.
J. Dairy Sci., 52, 8, 1186-1191.
319. SOSA (H.), EIGUER (T.), EMPAIRE (M. D.), 1963. - Estudio de caracteres bioquímicos de Aeromonas hydrophila.
Rev. Soc. Arg. Biol., 39, 5-8, 197-203.
320. SRINIVASAN (R. A.), ANANTHARAMAIAH (S. N.), ANANTHA-KRISHNAN (C. P.), YKA (K. K.), 1962. - Studies on milk bacterial enzyme for cheese making. I. Some factors influencing the elaboration of the enzyme bacteria.
XVth Int. Dairy Congr., Copenhagen, 13, 401-409.
321. SRINIVASAN (R. A.), IYENGA (M. K. K.), BABBAR (I. J.), CHAKRAVORTY (S. C.), DUDANI (A. T.), IYA (K. K.), 1964. - Milk clotting enzyme from microorganisms.
Appl. Microbiol., 12, 6, 475-478.
322. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS, 1967. -
12th Ed. American Public Health Assoc., New York.
323. STANIER (R. Y.), 1943. - A note on the taxonomy of Proteus hydrophilus.
Nat. Research-Council Paper, 1142, 213-214.

324. STANIER (R. Y.), ADAMS (G. A.), 1944. - The nature of Aeromonas fermentation.
Biochem. J., 38, 168-171.
325. STEEL (K. J.), 1961. - The oxidase-reaction as a taxonomic tool.
J. Gen. Microbiol., 25, 297-306.
326. STEEL (K. J.), MIDGLEY (J.), 1962. - Decarboxylase and other reactions of some Gram-negative rods.
J. Gen. Microbiol., 29, 171.
327. STEPANKOVSKAYA (L. D.), 1965. - Milk and dairy products a vehicles of infection in coli-enteritis.
Gig. i Sanit., 30, 80-81.
328. STEVENSON (J. P.), 1959. - A note on the genus Aeromonas.
J. Gen. Microbiol., 21, 366-370.
329. STILLE (W.), BASTERT (G.), HELM (E. B.), 1968. - Reise-diarrhoen und andere Reise-Infektionen.
Dtsch. med. Wschr., 93, 1350-1354.
330. SUASSUNA (I.), LACOMBE (S. C.), BARRETO (M. A.), SUASSUNA (I. R.), 1962. - The indole reactions of Enterobacteriaceae. I. A comparison of reagents for qualitative tests.
Ann. Microbiol., 10, 99-122.
331. SUASSUNA (I.), SUASSUNA (I. R.), 1962. - The indole reactions of Enterobacteriaceae. II. Cultural conditions affecting indole production.
Ann. Microbiol., 10, 123-145.
332. SZTUM RUBINSTEIN (S.), PIECHAUD (D.), 1959. - Sur l'utilisation du citrate dans la tribu des Escherichieae.
Ann. Inst. Pasteur, 93, 360-369.
333. TAYLOR (W. F.), ACHANZAR (D.), 1972. - Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae.
Appl. Microbiol., 24, 1, 58.
334. THIEULIN (G.), 1955. - Le problème du lait hygiénique.
La Presse médicale, 63, 28, 583.

335. THIEULIN (G.), BASILLE (D.), 1955. - Le contrôle sanitaire du lait. I. Inspection préventive du lait pasteurisé.
Bull. Acad. Vét., 6, 211-220.
336. THIEULIN (G.), BASILLE (D.), 1955. - Le contrôle sanitaire du lait. II. Techniques bactériologiques pour l'inspection du lait pasteurisé et signification des résultats.
Bull. Acad. Vét., 7, 313-325.
337. THIEULIN (G.), VUILLAUME (R.), 1967. - Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait, de produits laitiers et des oeufs.
3e éd., 388 p., Paris. Le Lait, 48, Av. Président Wilson, Paris (16e).
338. THOMAS (S. B.), 1955. - Coli-aerogenes bacteria in raw milk.
J. Appl. Bact., 18, 331
339. THOMAS (S. B.), 1958. - Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part. 1 and 2.
Dairy Sci. Abstr., 20, 355-447.
340. THOMAS (S. B.), 1966. - La provenance, la présence et l'importance des bactéries psychrophiles dans le lait.
Milchwiss., 21, 270-275.
341. THOMAS (S. B.), DRUCE (R. G.), 1969. - Psychrotrophic Bacteria in refrigerated pasteurized milk : a review.
Dairy Ind., 34, 6, 351-355; 37, 7, 430-433.
342. THOMAS (S. B.), HARCOTBE (J. M.), 1955. - Détermination de la teneur du lait en coli-aerogenes par des méthodes de culture en plaques.
Le Lait, 35, 604-618.
343. THOMAS (S. B.), HOBSON (P. M.), DRUCE (R. G.), 1959. - Coli-aerogenes bacteria in farm water supplies.
J. Appl. Bact., 22, 32-45.
344. THOMAS (S. B.), HOBSON (P. M.), ELSON (K.), 1958. - Coli-aerogenes bacteria from farm dairy equipment and raw milk.
J. Appl. Bact., 21, 58-64.

345. THORNLEY (M. J.), 1960. - The differentiation of Pseudomonas from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism.
J. Appl. Bact., 23, 37.
346. TSUGO (T.), YAMAUGH (K.), 1959. - Comparison of clotting action of various milk coagulating enzymes. I. Comparison of factors effecting clotting time of milk.
XVth Intern. Dairy Congr., London, 2, 636-642.
347. TYSSET (C.), BRISOU (J.), DURAND (C.), 1970. - Contribution à l'étude d'une épizootie sévissant sur les poissons blancs d'un lac artificiel de Haute-Provence.
Rec. Méd. Vét. Ec. Alfort, 146, 10, 1031-1043.
348. VASSILEFF (Th.), 1932. - Recherche et numération du coli-bacille dans le lait par la méthode du Rouge neutre.
Le Lait, 12, 318-331.
349. VAUGHIN (R. H.), KING (A. D.), NAGEL (C. W.), 1969. - Bactéries Gram-négatives associées au ramollissement des olives mûres en Californie.
J. Food Sci., 34, 3, 224-227.
350. VEILLET-PONCET (L.), 1968. - Aeromonas var. formicans (Crawford 1954) Leclerc 1962, bactérie indologène du lait pasteurisé conditionné.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 108, 15-19.
351. VEILLET-PONCET (L.), 1971. - Les Aeromonas, bactéries indologènes du lait pasteurisé conditionné.
Comm. Sect. Microbiol. alim. Soc. fr. Microbiol., juin 1971.
352. VEZINA (R.), DES ROCHERS (R.), 1971. - Incidence d'Aeromonas hydrophila chez la perche, Perca flavescens Mitchill.
Can. J. Microbiol., 17, 8, 1101-1103.
353. VOLF (F.), HAVELKA (J.), 1965. - Investigation of the cause of the infections dropsy of carp.
Ann. New York Acad. Sci., 126, 1, 601-605.
354. WANG (L. H.), RUTTLE (D. T.), HESSELTINE (C. W.), 1969. - Milk-clotting activity of proteinases produced by Rhizopus.
Can. J. Microbiol., 15, 99-104.

355. WASHINGTON (J. A.), 1972. - Aeromonas hydrophila in clinical bacteriology specimens.
Ann. Intern. Med., 76, 4, 611-614.
356. WHANG (H. Y.), HELLER (M. E.), NETER (E.), 1972. - Production by Aeromonas of common enterobacterial antigen and its possible taxonomic significance.
J. Bacteriol., 110, 1, 161-164.
357. WILKES (S. H.), MUKHERJEE (B. B.), WAGNER (F. W.), PRESCOTT (J. M.), 1969. - Partial purification and some enzymatic properties of a proteinase from Aeromonas proteolytica.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131, 2, 382-387.
358. WILSSENS (A.), DE VLEESCHAUWER (A.), 1958. - La détermination des Coliformes à 30° C dans le lait pasteurisé (résumé).
Le Lait, 38, 647-648.
359. WITTER (L. D.), 1961. - Psychrophilic Bacteria. A review.
J. Dairy Sci., 44, 983-1015.
360. WITTIG (H.), 1963. - Systematic examination of certified milk for pathogenic coliform bacteria with special reference to dyspeptic E. coli.
Tierärz. Hochsch., Hannover, Inaug. Diss. Doct. Med. Vet., 60 p.
361. WOLFE (M. W.), AMSTERDAM (D.), 1968. - New diagnostic system for the identification of lactose fermenting Gram-negative.
Appl. Microbiol., 16, 10, 1528.
362. ZAJC-SATLER (J.), 1972. - Morphological and biochemical studies of 27 strains belonging to the genus Aeromonas isolated from clinical sources.
J. Med. Microbiol., 5, 2, 263-265.
363. ZIMMERMANN (O. E. R.), 1890. - Die Bakterien unserer Trink und Nutzwasser, in besonders des Wassers der Chemnitzer Wasserleitung.
Ber. Natur. Ges. Chemnitz, 1, 38-39.

NOM DE L'ETUDIANT : Madame VEILLET Louise

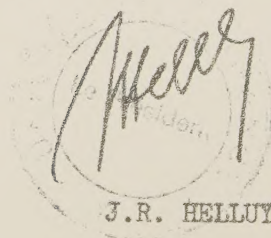
NATURE DE LA THESE : DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

VU, APPROUVE

& PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 7 décembre 1973

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



J.R. HELLUY

